

Université de Sherbrooke

**Le rôle du complexe MCM
dans la réponse aux cassures double brin de l'ADN**

Par
Romain Drissi
Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2017

Membres du jury d'évaluation

Dr. François-Michel Boisvert, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke

Dr. François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke

Dr. Guylain Boissonneault, Département de biochimie, Université de Sherbrooke

Dr. Jean-Yves Masson, Département de biologie moléculaire, de biochimie médicale et de pathologie, Université Laval

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont été présentes durant mes quatre années de thèse et qui m'ont aidé à arriver au bout de ce doctorat.

Je tiens plus particulièrement à remercier mon directeur de recherche, François-Michel Boisvert, pour l'opportunité qu'il m'a donnée de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité tout au long de ces années.

J'exprime également tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury : François Boudreau, Guylain Boissonneault, Jean-Yves Masson et François-Michel Boisvert.

Je tiens à remercier les membres de mon comité d'encadrement, Guylain Boissonneault et François Boudreau pour leurs conseils au cours de nos rencontres mais également les professeurs Caroline Saucier et Fernand-Pierre Gendron pour leurs conseils.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire, passés et présents. Donc merci aux Dominiques (Lévesque et Jean) pour avoir partagé leur expérience et leurs expertises. Merci également à Mélanie, Marie-Line, Elie, Patrick, Alex-Ane, Vincent et Emma.

Un grand merci à Etienne Lemieux, Sébastien Cagnol « Babao » et Jean-Philippe Babeu « JiPi » pour toutes les discussions scientifiques (ou non), au détour d'un couloir.

Je remercie également ma famille, dont mes parents, qui m'ont soutenu jusqu'ici et qui ont cru en moi. Mais également un grand merci à tous mes amis qui sont restés en France et qui sont ma deuxième famille, qui ont toujours été là pour me soutenir, pour me changer les idées, pour les discussions par Skype, et qui ont toujours répondu présents pour les rares moments passés en vacances. Un énorme merci à Poudreuz, Mika, Nico, Elias, Ben, Marion GV, Mimi, Joris, François, Bouclette, Coline, Laura, Laurent, Marion L (et j'en oublie sûrement), qui ont chacun joué un rôle à certains moments.

Un grand merci également à Lauriane et Ariane, dites « les Rianes », qui m'ont permis de faire la transition entre Grenoble et le Québec et qui m'ont présenté de nouveaux amis fabuleux que je ne remercierai jamais assez pour les week-ends à Montréal, les chalets passés avec eux à profiter des spas et leurs week-ends « champêtres » à Sherbrooke. Merci à Fred, Jérémy, Axelle, Nico, Sylvain, Jérôme, Guillaume. Un merci spécial à Amandine, pour tout.

Merci également à Pierre, Marine, Joris, Caro, Tomas, Mélissa, Sam, Jamie, André-Jean, Christophe et Angélique pour tous les bons moments passés à Sherbrooke.

Pour finir je tiens également à remercier Anaïs, qui m'a soutenu au cours de cette dernière année, qui m'a permis de tenir jusqu'au bout et qui m'a toujours encouragé même lorsque cela devenait difficile. Alors un immense merci de partager ma vie.

RÉSUMÉ

Le rôle du complexe MCM dans la réponse aux cassures double brin de l'ADN

Par

Romain Drissi

Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le complexe MCM est un complexe protéique à activité hélicase responsable de l'ouverture de la double hélice d'ADN au cours de la réplication. Composé des protéines MCM2 à MCM7, ce complexe apparaît surexprimé dans différents types de cancers, mais est également décrit pour être présent en quantité plus importante que nécessaire pour assumer sa fonction principale d'hélicase. Cette observation laisse penser que le complexe MCM pourrait jouer un rôle secondaire dans la cellule. De plus, contrairement à la plupart des protéines, chaque élément du complexe MCM présente un changement spécifique dans leur association à la chromatine suite à un traitement à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase 2. Par ailleurs, les liens existants entre les protéines MCM2, MCM3 et ATM, ATR, des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, suggèrent que ce complexe MCM pourrait être impliqué dans la réponse aux cassures double brin de l'ADN.

L'identification des partenaires d'interaction du complexe MCM en réponse à l'étoposide a été réalisée grâce notamment à une approche de protéomique spatiale. Dans un premier temps, nous avons identifié un changement de localisation des protéines MCM en réponse à l'étoposide et dans un deuxième temps, nous avons observé une augmentation d'interaction entre MCM2 et ASF1, Paladin et Importin 7 mais également une baisse d'interaction entre MCM2 et CHD3. De plus nous avons mis en évidence une colocalisation d'ASF1 et de γ H2AX en réponse à l'étoposide. Des expériences utilisant des shARN ciblant les protéines MCM2 ou MCM3 ont permis de constater qu'une déstabilisation du complexe MCM entraînait un changement dans la signalisation des cassures double brin de l'ADN ainsi qu'une altération du mécanisme de réparation de la recombinaison homologue contrairement à la réparation par jonction d'extrémités non homologues. Cependant, aucune modification de la sensibilité des cellules à l'étoposide n'avait pu être observée.

Ainsi les protéines MCM semblent présenter une dynamique d'interaction en réponse à l'étoposide et un rôle important dans la réponse aux dommages double brin, et plus particulièrement dans la Recombinaison Homologue.

Mots clés : Protéines MCM, Protéomique, Mécanismes de réparation de l'ADN, Recombinaison Homologue

TABLE DES MATIERES

1.	Introduction.....	1
1.1	Introduction générale.....	1
1.2	Les mécanismes de réparation des dommages simple brin.....	3
1.2.1	La réparation par excision de base (BER).....	3
1.2.2	La réparation par excision de nucléotide (NER).....	6
1.2.3	La réparation des mésappariements (MMR).....	10
1.3	Les mécanismes de réparation des cassures double brin (CDB).....	12
1.3.1	La cascade de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR).....	12
1.3.1.1	<i>Les protéines de reconnaissance des cassures double brin....</i>	<i>13</i>
1.3.1.1.1	Le complexe Ku70/Ku80.....	13
1.3.1.1.2	La protéine H2AX.....	14
1.3.1.1.3	La protéine MDC1.....	15
1.3.1.1.4	Le complexe MRN.....	16
1.3.1.2	<i>Les transducteurs du signal des cassures double brin.....</i>	<i>16</i>
1.3.1.2.1	La protéine DNA-PKcs.....	17
1.3.1.2.2	La protéine ATM.....	18
1.3.1.2.3	La protéine ATR.....	18
1.3.1.3	<i>Les médiateurs du signal des cassures double brin.....</i>	<i>19</i>
1.3.1.3.1	La protéine CHK2.....	19
1.3.1.3.2	La protéine CHK1.....	20
1.3.2	La réparation des cassures double brin de l'ADN.....	21
1.3.2.1	<i>La réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues (NHEJ).....</i>	<i>21</i>
1.3.2.1.1	Mécanisme de réparation de la NHEJ classique....	22
1.3.2.1.1.1	Etape 1 : Reconnaissance des CDB.....	22
1.3.2.1.1.2	Etape 2 : Préparation de l'ADN.....	23

1.3.2.1.1.3 Etape 3 : Ligation des deux brins d'ADN.....	25
1.3.2.1.2 Mécanisme de réparation de la NHEJ alternative.	26
1.3.2.2 La réparation par Recombinaison Homologue (HR).....	28
1.3.3 Le remodelage de la chromatine.....	32
1.4 Les protéines MCM.....	35
1.4.1 Le complexe hexamérique MCM.....	36
1.4.2 Le rôle des MCM dans la réplication de l'ADN.....	38
1.4.3 Le paradoxe des protéines MCM.....	40
1.4.4 Le complexe MCM et les dommages à l'ADN.....	41
1.5 Protéines possiblement impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	43
1.5.1 Importine 7.....	43
1.5.2 Paladin.....	43
1.5.3 ASF1A.....	44
2. Problématique et hypothèse.....	45
3. Matériel et méthodes.....	46
3.1 Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	46
3.1.1 Lignées cellulaires.....	46
3.1.1.1 U2OS FT.....	46
3.1.1.2 HEK 293.....	47
3.1.2 Culture cellulaire en milieu SILAC.....	47
3.1.3 Induction des dommages à l'ADN.....	47
3.2 Clonage et génération des lignées cellulaires stables.....	48
3.2.1 Lignées cellulaires stables U2OS pgLAP1 GFP-MCM2, GFP-MCM5... 48	
3.2.1.1 Extraction de l'ARN messenger des cellules U2OS.....	48
3.2.1.2 Génération d'une bibliothèque d'ADN complémentaires (ADNc) par RT-PCR.....	48
3.2.1.3 Amplification des ADNc MCM2 et MCM5.....	49

3.2.1.4	<i>Incorporation en vecteur pDONR 221.....</i>	49
3.2.1.5	<i>Clonage par Gateway cloning.....</i>	50
3.2.1.6	<i>Transfection en cellules U2OS FT.....</i>	50
3.2.1.7	<i>Sélection et induction.....</i>	51
3.2.2	Lignées cellulaires stables HEK293 pDRGFP et pimΔEJ5.....	51
3.2.2.1	<i>Modification de la résistance des plasmides.....</i>	52
3.2.2.2	<i>Transfection en cellules HEK293.....</i>	52
3.2.2.3	<i>Sélection.....</i>	53
3.2.3	Amorces PCR utilisées pour les clonages.....	54
3.3	Production des shARN.....	54
3.3.1	Production des lentivirus.....	55
3.3.2	Infection des cellules.....	55
3.4	Immunofluorescence.....	55
3.5	Fractionnement cellulaire.....	56
3.5.1	Études des changements de localisation protéique.....	56
3.5.2	Étude du phospho-protéome.....	56
3.6	Immunoprécipitation.....	57
3.7	Digestion protéique.....	57
3.7.1	Étude du phospho-protéome.....	57
3.7.1.1	<i>Digestion liquide.....</i>	57
3.7.1.2	<i>Enrichissement des phosphopeptides.....</i>	58
3.7.2	Digestion sur gel.....	58
3.8	Tests de croissance cellulaire.....	59
3.9	FACS (Fluorescence-activated cell sorting).....	59
3.10	Tests de survie ou « Tests MTT ».....	60
3.11	Immunobuvardage	60
3.12	Analyse LC/MS-MS et quantification.....	61
3.12.1	Analyse LC/MS-MS.....	61
3.12.2	Quantification et analyse bioinformatique.....	62

3.13 Anticorps utilisés.....	63
4 Résultats.....	64
4.1 La protéomique quantitative révèle des changements d'interaction du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide.....	64
4.1.1 Le complexe MCM change de localisation en réponse aux cassures double brin (CDB) induites par l'étoposide.....	64
4.1.2 Identification des partenaires d'interaction des protéines MCM2 et MCM5.....	67
4.1.3 Identification des partenaires d'interaction des protéines MCM en réponse à l'étoposide.....	71
4.1.4 Identification des modifications post-traductionnelles (PTMs) des protéines MCM en réponse à l'étoposide.....	73
4.1.5 Confirmation des changements d'interaction en réponse à l'étoposide.....	75
4.1.6 Les protéines MCM et ASF1A interagissent à la chromatine en réponse à l'étoposide.....	77
4.2 La déstabilisation du complexe MCM module la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par l'étoposide.....	79
4.2.1 Une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 n'affecte pas la croissance cellulaire.....	79
4.2.2 Les shARN ciblant les protéines MCM2 ou MCM3 déstabilisent le complexe MCM.....	81
4.2.3 La déstabilisation du complexe MCM altère la réponse aux dommages à l'ADN.....	83
4.2.4 La déstabilisation du complexe MCM n'altère pas le cycle cellulaire ni la sensibilité des cellules à l'étoposide.....	84

4.2.5	La déstabilisation du complexe MCM entraîne une altération dans la Recombinaison Homologue mais pas dans la réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues.....	89
4.2.6	Effet d'une diminution du niveau d'expression des protéines MCM sur le phospho-protéome en réponse à l'étoposide.....	94
5	Discussion.....	97
5.1	La protéomique quantitative révèle des changements d'interaction du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide.....	97
5.1.1	Changement de localisation du complexe MCM en réponse aux CDB.....	97
5.1.2	Identification des partenaires d'interaction du complexe MCM par spectrométrie de masse.....	99
	<i>5.1.2.1 Identification des partenaires d'interaction des protéines recombinantes GFP-MCM2 et GFP-MCM5.....</i>	<i>99</i>
	<i>5.1.2.2 Changements des interactions de la protéine MCM2 en réponse à l'étoposide.....</i>	<i>100</i>
5.1.3	Augmentation de l'interaction entre les protéines MCM2 et ASF1A en réponse aux CDB.....	102
5.1.4	Colocalisation des protéines MCM2, ASF1A et γ H2AX.....	102
5.2	La déstabilisation du complexe MCM module la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par l'étoposide.....	104
5.2.1	Effets d'une diminution des protéines MCM sur la cellule.....	104
5.2.2	Effets d'une diminution des protéines MCM dans la réponse cellulaire aux CDB.....	106
5.2.3	Effets d'une diminution des protéines MCM sur la sensibilité cellulaire aux CDB.....	110
5.2.4	Effets d'une diminution du complexe MCM sur le phospho-protéome en réponse aux CDB.....	111

6	Conclusions et perspectives.....	115
6.1	Le rôle du complexe MCM dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide n'implique pas son activité hélicase.....	116
6.2	L'activité hélicase du complexe MCM joue un rôle dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN.....	118
	Liste des références.....	122
	 Annexe 1. Quantitative Proteomics Reveals Dynamic Interactions of the Minichromosome Maintenance Complex (MCM) in the Cellular Response to Etoposide Induced DNA Damage.....	 165
	Annexe 2. Proteomics methods for subcellular proteome analysis.....	198

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Schéma général des principaux mécanismes de réparation mis en jeu en réponse aux dommages à l'ADN.....	2
Figure 2.	Schéma de la réparation par excision de base (BER).....	5
Figure 3.	Schéma de l'étape de reconnaissance dans le mécanisme de réparation par excision de nucléotide « GG-NER » et « TC-NER ».....	7
Figure 4.	Schéma des étapes d'incision, d'élimination de la lésion et de ligation du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER).....	9
Figure 5.	Schéma du mécanisme de la réparation des mésappariements (MMR).	11
Figure 6.	Schéma des mécanismes de la signalisation des dommages à l'ADN.....	21
Figure 7.	Schéma de l'étape de reconnaissance de la NHEJ.....	23
Figure 8.	Schéma de l'étape de préparation de l'ADN lors de la NHEJ classique...	24
Figure 9.	Schéma de l'étape de ligation des deux brins d'ADN lors de la NHEJ classique.....	26
Figure 10.	Schéma du mécanisme de la NHEJ alternative.....	27
Figure 11.	Schéma de l'initiation de la Recombinaison Homologue.....	29
Figure 12.	Schéma de la suite du mécanisme de la Recombinaison Homologue.....	31
Figure 13.	Schéma du complexe MCM.....	37
Figure 14.	Schéma du recrutement du complexe MCM pour la réplication.....	39
Figure 15.	Schéma des interactions entre les protéines MCM et les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.....	42
Figure 16.	Schéma du plasmide pFRT/LacZeo nécessaire à la production de lignées cellulaires Flp-In™ résistantes à la Zéocine et possédant un site d'intégration FRT.....	46
Figure 17.	Schéma décrivant le principe de la réaction BP (attB x attP) permettant l'incorporation d'un gène d'intérêt dans un vecteur pDONR 221.....	49
Figure 18.	Schéma décrivant le principe de la réaction LR (attL x attR) permettant l'incorporation d'un gène d'intérêt dans un vecteur pgLAP1.....	50
Figure 19.	Schéma représentant les modifications effectuées sur le plasmide pimEJ5.....	53
Figure 20.	Relocalisation subcellulaire en réponse aux dommages à l'ADN.....	66
Figure 21.	Génération de lignées cellulaires stables exprimant les protéines GFP-MCM2 ou GFP-MCM5.....	68
Figure 22.	Purification par affinité et analyse par spectrométrie de masse des protéines GFP-MCM2 et GFP-MCM5 pour identifier les partenaires d'interaction.....	70
Figure 23.	Interactions dynamiques du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN.....	72
Figure 24.	Identification des modifications post-traductionnelles (PTMs) sur les protéines du complexe MCM.....	74

Figure 25.	Les interactions entre les protéines ASF1A et MCM2 sont augmentées à la suite de dommages à l'ADN.....	76
Figure 26.	Colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A aux sites de dommages à l'ADN.....	78
Figure 27.	Contrôle des lignées cellulaires infectées par shARN.....	80
Figure 28.	Analyse de l'expression du complexe MCM dans les cellules U2OS infectées avec les shARN contrôle ou ciblant les protéines MCM2 ou MCM3.....	81
Figure 29.	La déstabilisation du complexe MCM entraîne une diminution de phosphorylation de la protéine H2AX sur sa Sérine 139.....	82
Figure 30.	Effet d'une diminution du complexe MCM sur la réponse aux dommages à l'ADN.....	84
Figure 31.	Effet d'une diminution du complexe MCM sur le cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN.....	85
Figure 32.	Effet d'une diminution du complexe MCM sur la phosphorylation de P53 en réponse aux dommages à l'ADN.....	86
Figure 33.	Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide (concentrations A).....	87
Figure 34.	Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide (concentrations B).....	88
Figure 35.	Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide par test MTT.....	89
Figure 36.	Schéma du plasmide pDRGFP.....	90
Figure 37.	Schéma du plasmide pimΔEJ5.....	91
Figure 38.	Effets d'une diminution du complexe MCM sur les mécanismes de réparation des cassures double brin.....	93
Figure 39.	Effets d'une diminution du complexe MCM sur le phospho-protéome en réponse aux cassures double brin.....	96
Figure 40.	Postulat n°1 : Le complexe MCM servirait de plateforme de recrutement pour les protéines de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	117
Figure 41.	Postulat n°2 : Le complexe MCM joue un rôle sur le remodelage de la chromatine et facilite le recrutement des protéines de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Liste des différents milieux SILAC utilisés avec les différents marquages isotopiques et les références des produits.....	47
Tableau 2.	Liste des différentes amorces utilisées lors des réactions PCR pour le clonage.....	54
Tableau 3.	Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage et d'immunofluorescence.....	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
alt-NHEJ	Jonction des extrémités non homologues alternative [<i>alternative Non-Homologous End Joining</i>]
AP	Apurique/apyrimidique
APC	Anaphase-promoting complex
APE1	DNA-[apurinic or apyrimidinic site] lyase
APLF	Aprataxin and PNK-like factor
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Artemis	DNA cross-link repair 1C protein
ASF1A	Anti-silencing function protein 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related
ATRIP	ATR interacting protein
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2
BCLAF1	Bcl2-associated transcription factor 1
BER	Réparation par excision de base [<i>Base Excision Repair</i>]
BLM	Bloom syndrome protein
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
BRCT	BRCA1 C-terminal domain
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA	Bovine serum albumine
CAK	CDK-activating kinase
CDB	Cassure double brin
CDC6	Cell division control protein 6 homolog
CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase
CDK2	Cyclin dependant kinase 2
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CDT1	DNA replication factor Cdt1
CETN2	Centrine 2
CHD	Chromodomain helicase DNA binding
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHK2	Checkpoint kinase 2
CK2	Casein Kinase 2
c-NHEJ	Jonction des extrémités non homologues classique [<i>classical Non-Homologous End Joining</i>]

CS	Syndrome de Cockayne [<i>Cockayne Syndrome</i>]
CSA	Cockayne syndrome WD repeat protein A
CSB	Cassure simple brin
CSB*	Cockayne syndrome WD repeat protein B
CtIP	CtBP-interacting protein
DAPI	4.6-diamidino-2-phénylindole
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DBF4	Protein DBF4 homolog A
DDB1	DNA damage binding protein 1
DDR	Réponse aux dommages à l'ADN [<i>DNA Damage Response</i>]
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase complex
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DTT	Dithiothréitol
ERCC1	DNA excision repair protein ERCC-1
EXO1	Exonucléase 1
FEN1	Flap endonucléase 1
FA	Acide formique
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FHA	Forkhead-associated
Flp	Flippase
FRT	Cible de la recombinaison pour Flp [<i>Flp Recombination Target</i>]
FT	Flp-In TM T-Rex TM
GFP	Green Fluorescent Protein
GG-NER	Réparation par excision de nucléotide sur le génome entier [<i>Global Genome Nucleotide Excision Repair</i>]
HDAC10	Histone désacétylase 10
HJ	Jonction de Holliday [<i>Holliday Junction</i>]
HMGB1	High mobility group protein B1
HR	Recombinaison homologue [<i>Homologous Recombination</i>]
HSP	Heat shock protein
IAA	Iodoacétamide
ID	Insertion/Délétion
IDL	Insertion/Deletion Loop
IMP7	Importine 7
INO80	Putative DNA helicase INO80
IP	Immunoprécipitation
IP*	Iodure de propidium
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC/MS-MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
Lig3	ADN ligase III
MAT1	CDK-activating kinase assembly factor MAT1
MCM	Minichromosome maintenance

MCM1	Protein MCM1 homolog
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3
MCM4	DNA replication licensing factor MCM4
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5
MCM6	DNA replication licensing factor MCM6
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7
MCM8	DNA helicase MCM8
MCM9	DNA helicase MCM9
MCM10	Protein MCM10 homolog
MCMBP	MCM binding protein
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MLH1	DNA mismatch repair protein MLH1
MMEJ	Jonction des extrémités médiée par micro-homologie [<i>Microhomology-mediated end joining</i>]
MMR	Réparation des mésappariements [<i>Mismatch Repair</i>]
MRE11	Meiotic Recombination 11 Homolog 1
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 complex
MSH2	DNA mismatch repair protein MSH2
MSH3	DNA mismatch repair protein MSH3
MSH6	DNA mismatch repair protein MSH6
MTT	Sel de tétrazolium [<i>Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium</i>]
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NER	Réparation par excision de nucléotides [<i>Nucleotide Excision Repair</i>]
NHEJ	Jonction des extrémités non homologues [<i>Non-Homologous End Joining</i>]
NLS	Signal de localisation nucléaire [<i>Nuclear Localisation Signal</i>]
NPM1	Nucléophosmine
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PALD1	Paladin
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIKK	Phosphoinositol 3-kinase-related kinase
PIP box	PCNA-interacting protein box
PMS2	Mismatch repair endonuclease PMS2
PNPK	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase
Pol	Polymérase
Pré-RC	Pré-réplication
PTM	Modification post-traductionnelle [<i>Post-Translational Mutation</i>]
RAD23B	UV excision repair protein RAD23 homolog B
RAD50	RAD50 double strand break repair protein
RAD51	DNA repair protein RAD51 homolog 1

RAD52	DNA repair protein RAD52 homolog
RFC	Replication factor C
RI	Radiation ionisante
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène [<i>Reactive Oxygen Species</i>]
RPA	DNA-directed RNA polymerase I
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
ST/SQ	Serine/Thréonine-Glutamine
SWI/SNF	Switch/Sucrose non-fermentable
TC-NER	Réparation par excision de nucléotide couplée à la transcription [<i>Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair</i>]
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TFIIH	Transcription factor IIH
TFA	Acide trifluoroacétique
TopB1	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TP53BP1	TP53-binding protein 1
TTD	Trichothiodystrophie
UPP1	Uridine phosphorylase 1
USP7	Ubiquitin-specific-processing protease 7
UV	Ultraviolet
UV-DDB	Ultraviolet-DNA damage protein
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene protein
UV-SSA	UV-stimulated scaffold protein A
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
XLF	XRCC4-like factor
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	Xeroderma Pigmentosum, protein A
XPB	Xeroderma Pigmentosum, protein B
XPC	Xeroderma Pigmentosum, protein C
XPD	Xeroderma Pigmentosum, protein D
XPF	Xeroderma Pigmentosum, protein F
XPB	Xeroderma Pigmentosum, protein G
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4

1. Introduction

1.1 Introduction générale

L'ADN constitue notre patrimoine génétique. Il est répliqué pour se transmettre de cellule en cellule. Il est donc impératif pour la cellule de maintenir son intégrité génétique afin d'empêcher toute accumulation d'aberrations ou de mutations. En effet, l'ADN est la cible de nombreuses attaques, tant internes qu'externes. En d'autres termes, un dommage survenant sur l'ADN peut être induit de manière endogène (De Bont and van Larebeke 2004) par des erreurs de métabolisme (Toshiki Tanaka, Huang, et al. 2007), des stress oxydatifs (Helbock et al. 1998; Fraga et al. 1990), ou bien par des sources exogènes. Ces dernières peuvent être naturelles, comme les rayons cosmiques et les rayons ultraviolets (UV), ou provoquées par l'homme avec par exemple l'utilisation d'outils diagnostics ou thérapeutiques comme la radiothérapie et les radiations ionisantes (RI) (Vignard, Mirey, and Salles 2013). L'ensemble de ces phénomènes peut induire des erreurs au sein du code génétique, pouvant ainsi provoquer des altérations au niveau de l'ADN (Toshiki Tanaka, Kajstura, et al. 2007). Face à ces attaques, la cellule a développé un mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN (*DNA Damage Response* ou DDR) qui permet de ralentir ou d'arrêter le cycle cellulaire et d'activer des mécanismes de réparation de l'ADN selon le type de dommage. Il est alors possible de distinguer cinq mécanismes principaux : d'une part la Réparation par Excision de Nucléotide (*Nucleotide Excision Repair* ou NER), la Réparation par Excision de Base (*Base Excision Repair* ou BER) et la Réparation des Mésappariements (*Mismatch Repair* ou MMR), et d'autre part la Recombinaison Homologue (*Homologous Recombination* ou HR) et la réparation par Jonction des Extrémités Non Homologues (*Non-Homologous End Joining* ou NHEJ) (Figure 1). Une accumulation trop importante de ces dommages à l'ADN ou un défaut dans un ou plusieurs des mécanismes de réparation cités précédemment, peut entraîner une réparation incorrecte et/ou imprécise de l'ADN, générant alors des désordres génétiques (Gregg, Robinson, and Niedernhofer 2011).

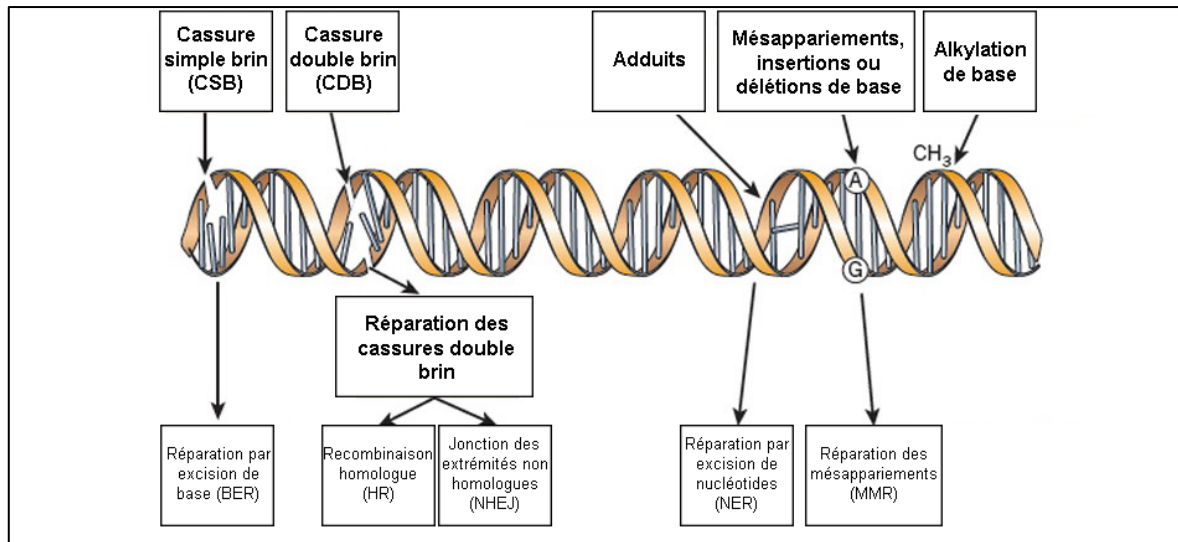


Figure 1. Schéma général des principaux mécanismes de réparation mis en jeu en réponse aux dommages à l'ADN (Schéma adapté de Lord and Ashworth 2012).

De nombreuses maladies ont pour origine une ou des mutations touchant une ou plusieurs des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Par exemple, la maladie de l'Ataxie Téléangiectasie a pour origine une mutation sur le gène codant pour la protéine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Savitsky et al. 1995), ou encore le syndrome de Nimègue, dans lequel on retrouve une mutation sur le gène codant pour la protéine NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome protein 1*) (Varon et al. 1998). Les cellules vont alors présenter une incapacité à réparer l'ADN ce qui peut favoriser l'apparition de cancers et induire des désordres génétiques. Par ailleurs, il a été montré qu'une surexpression des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN pouvait entraîner une résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques. C'est notamment le cas dans le carcinome oral à cellules squameuses dans lequel une surexpression de la protéine DNA-PK (protéine impliquée dans un mécanisme de réparation qui sera détaillé plus loin) est corrélée à une résistance aux traitements par RI (Shintani et al. 2003).

Parmi tous les types de dommages pouvant survenir dans une cellule, les plus importants sont les cassures double brin (CDB) (Obe, Johannes, and Schulte-Frohlinde 1992). Bien que ces dommages ne soient pas les plus nombreux, ils ont la capacité de provoquer l'entrée des cellules en apoptose (Norbury and Zivnotovsky 2004). Cette

spécificité des CDB a encouragé au cours de ces dernières décennies, le développement de traitements anticancéreux ciblant spécifiquement l'ADN (Schwartz et al. 1988). L'induction de tels dommages sur les cellules ayant une prolifération active, comme les cellules cancéreuses, s'est avérée être une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante.

Dans ce contexte, il apparaît donc comme indispensable d'approfondir les connaissances sur la DDR en utilisant des agents générant des CDB tels que l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Montecucco and Biamonti 2007). Cela permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de cibler plus spécifiquement les protéines impliquées dans cette réponse cellulaire afin d'optimiser les traitements existants.

1.2 Les mécanismes de réparation des dommages simple brin

L'ADN est soumis à de nombreux types de dommages, tous différents les uns des autres. Afin de palier à cette multiplicité, la cellule possède divers mécanismes de réparation distincts qui vont intervenir en fonction du dommage reconnu. Suite à des modifications de l'ADN telles qu'une oxydation, un adduit ou encore une alkylation, il est alors possible de distinguer la NER, la BER et la MMR (Figure 1).

1.2.1 La réparation par excision de base (BER)

La BER a été décrite pour la première fois par Tomas Lindahl en 1974 lorsqu'il a identifié la première enzyme impliquée dans le fonctionnement de ce mécanisme (T Lindahl 1974). Cette enzyme, une ADN glycosylase, était capable de cliver la liaison entre une base uracile et un désoxyribose, générant ainsi un site abasique (site AP : apurique/apyrimidique). Ce mécanisme est principalement activé suite à une modification survenant sur l'ADN telle qu'une oxydation, une alkylation ou encore une désamination. Généralement, ces petites lésions n'impliquent pas de perturbations majeures au niveau de la structure de l'ADN et sont en grande partie dues au processus normal de

détérioration de l'ADN (Tomas Lindahl 1993). Néanmoins, il peut arriver que des dommages similaires puissent être générés par des sources environnementales ou suite à un traitement par des agents cytostatiques.

Suite à la présence d'un dommage, la BER va être initiée par une étape de reconnaissance du dommage au sein de l'ADN par une des onze ADN glycosylases existantes (Fortini et al. 1999). Ces dernières seront, par la suite, activées en fonction du type de lésion. Au sein de ces glycosylases, deux groupes fonctionnels apparaissent : les glycosylases monofonctionnelles et les glycosylases bi-fonctionnelles. Alors que les premières vont pouvoir cliver la base par simple hydrolyse, les deuxièmes vont en plus pouvoir activer un mécanisme impliquant une lyase pour catalyser une réaction de lyase AP. Dans tous les cas, cela mènera à la formation d'un site AP (Figure 2A). Suite à la formation de ce site, le sucre restant sera alors éliminé par une endonucléase AP. La brèche sera alors comblée par une ADN polymérase et l'ADN sera finalement ligué.

Dans le cas des glycosylases bi-fonctionnelles, l'endonucléase APE1 (*DNA-[apurinic or apyrimidinic site] lyase*) va être recrutée pour cliver le sucre libre en 5' (Figure 2B) (Ranalli, Tom, and Bambara 2002). Une deuxième enzyme, l'ADN Pol- β (ADN polymérase bêta), va permettre l'élimination du sucre du site AP pour favoriser la ligation (Figure 2C) (Matsumoto and Kim 1995; Singhal and Wilson 1993; Sobol et al. 1996) et va combler la brèche au sein de l'ADN en ajoutant un nucléotide. Par la suite, le complexe Lig3/XRCC1 (Figure 2D) composé de l'ADN ligase III et de la protéine de réparation de l'ADN XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*), est recruté pour faciliter la ligation des brins d'ADN (Wei et al. 1995; Kubota et al. 1996) (Figure 2E). L'ensemble de ce procédé est appelé la « BER short-patch » (Figures 2A-E), généralement associée aux glycosylases impliquées dans l'élimination des bases oxydées mais qui se différencie de la « BER long-patch » (Figures 2A, F-I) (Frosina et al. 1996). Au cours de ce processus alternatif, l'ADN glycosylase recrutée ne présente pas d'activité de lyase. La protéine APE1 est alors recrutée et va créer une incision en 5' du site AP (Figure 2F). Cela va permettre le recrutement des protéines et la formation d'un complexe composé des ADN polymérases δ et ϵ et de PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*). Ce complexe va permettre la

synthèse d'un brin complémentaire de même taille (Figure 2G). Le recrutement de FEN1 (*Flap endonuclease 1*) va entraîner la coupure au niveau de la jonction simple/double brin (Figure 2H) et le recrutement de l'ADN ligase I va permettre la ligation (Figure 2I).

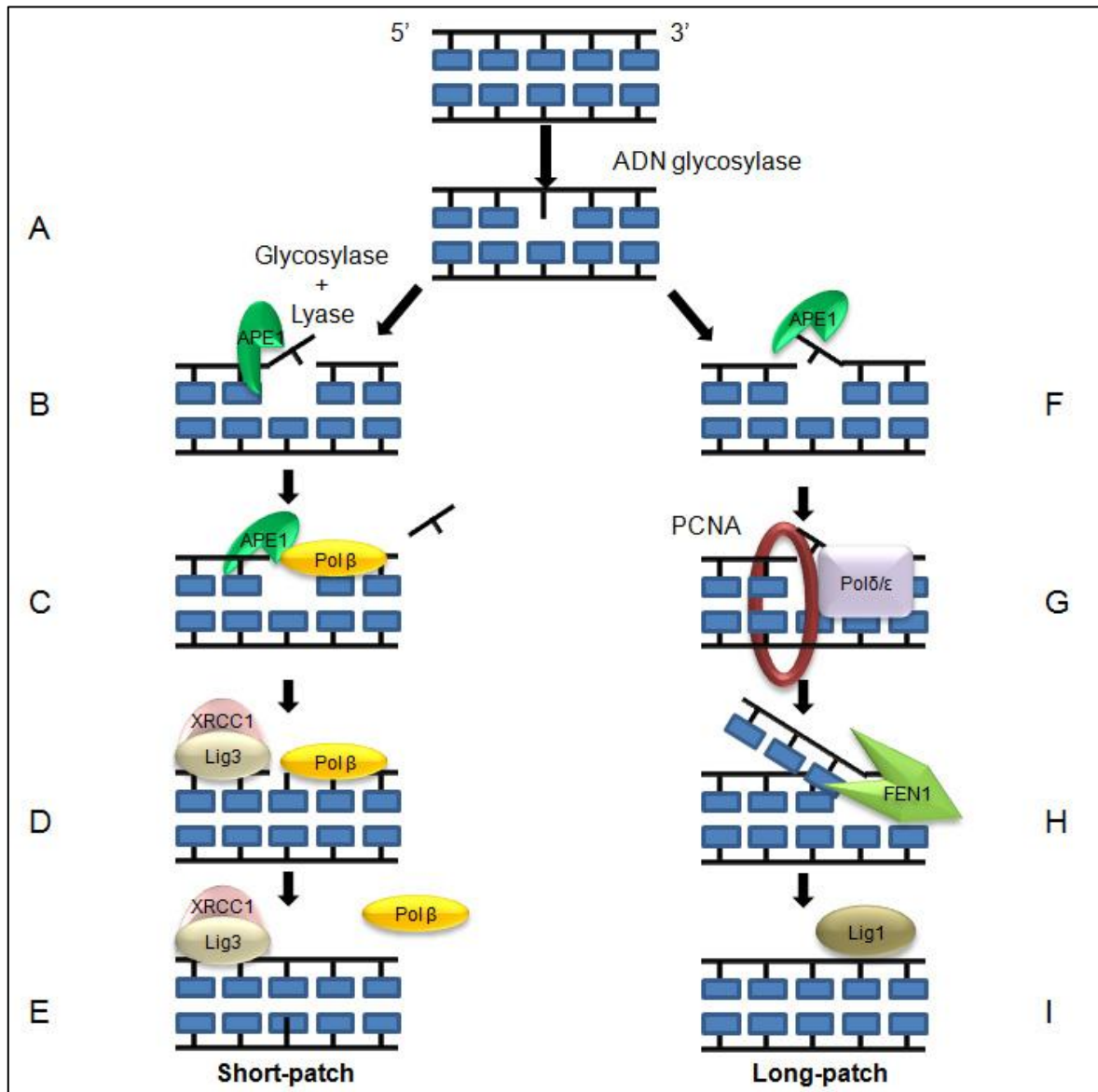


Figure 2. Schéma de la réparation par excision de base. (A) Reconnaissance du dommage à l'ADN par l'ADN glycosylase. (B-E) Mécanisme de la « BER short-patch ». (B) Réaction de lyase clivant l'ADN en 3'. (C) Recrutement des protéines APE1 et Pol β . APE1 clive le sucre en 5' qui sera enlevé par la Pol β . (D) Synthèse de l'ADN et recrutement du complexe Lig3/XRCC1. (E) Ligation de l'ADN. (F-I) Mécanisme de la « BER long-patch ». (F) APE1 clive le brin d'ADN en 5' du site AP. (G) Recrutement de PCNA et des ADN Pol δ/ϵ pour synthétiser un brin d'ADN complémentaire. (H) Recrutement de la protéine FEN1 qui clive l'ADN au niveau de la jonction simple/double brin. (I) Recrutement de l'ADN ligase 1 pour liguer l'ADN.

La discrimination entre la « BER short-patch » ou « long-patch » est encore soumise à discussion. En effet, plusieurs hypothèses existent pour expliquer le choix de l'une ou l'autre de ces BER. Une des hypothèses pouvant expliquer le changement du « short-patch » en faveur du « long-patch » serait la concentration en ATP aux abords du site de dommage. Cette concentration pourrait être modulée par l'ADN ligase III et la protéine XRCC1 (Petermann, Ziegler, and Oei 2003). Une seconde hypothèse suggérerait que la BER initiée par un site AP résultant d'une hydrolyse spontanée mènerait au « long-patch » alors que celle initiée par la glycosylase/lyase conduirait au « short-patch » (Klungland and Lindahl 1997).

1.2.2 La réparation par excision de nucléotide (NER)

En présence d'adduits sur l'ADN suite à une exposition à des RI, des UV, des agents chimiques, ou par la présence anormale de protéines ou d'adduits sur l'ADN, la NER va pouvoir être activée et une trentaine de protéines associées vont être recrutées (Hoeijmakers 1993). Ce mécanisme revêt une importance particulière car plusieurs syndromes lui ont été associés lors de délétions ou mutations au sein de gènes impliqués dans la NER comme le Xeroderma pigmentosum (XP) (English and Swerdlow 1987), le syndrome de Cockayne (CS) (Nance and Berry 1992) ou encore les trichothiodystrophies (TTD) (Bergmann and Egly 2001).

Lors de la détection d'une distorsion de l'ADN, deux étapes successives de reconnaissance de la lésion et d'incision de l'ADN surviennent, suivies des étapes d'élimination de la lésion et de ligation de l'ADN. Il est possible de distinguer deux types de NER, la GG-NER (*Global Genome Nucleotide Excision Repair*) (Figure 3A-C) qui permet de détecter et d'éliminer des lésions dans le génome entier et la TC-NER (*Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair*) (Figure 3D-F) qui permet la réparation des gènes en cours de transcription uniquement.

Dans le cadre de la GG-NER, les dommages sont détectés par le complexe XPC/CETN2/RAD23B (*Xeroderma Pigmentosum, protein C/centrin-2/UV excision repair protein RAD23 homolog B*) (Figure 3A) (Sugasawa et al. 1998; Masutani et al. 1994; Nishi

et al. 2005) avec l'aide du complexe UV-DDB (*Ultraviolet-DNA damage protein*) (Hakem 2008; Chu and Chang 1988) (Figure 3B). Suite à la liaison du complexe de reconnaissance des dommages, RAD23B va alors se dissocier du complexe (Scrima et al. 2008; Wakasugi et al. 2002) (Figure 3C).

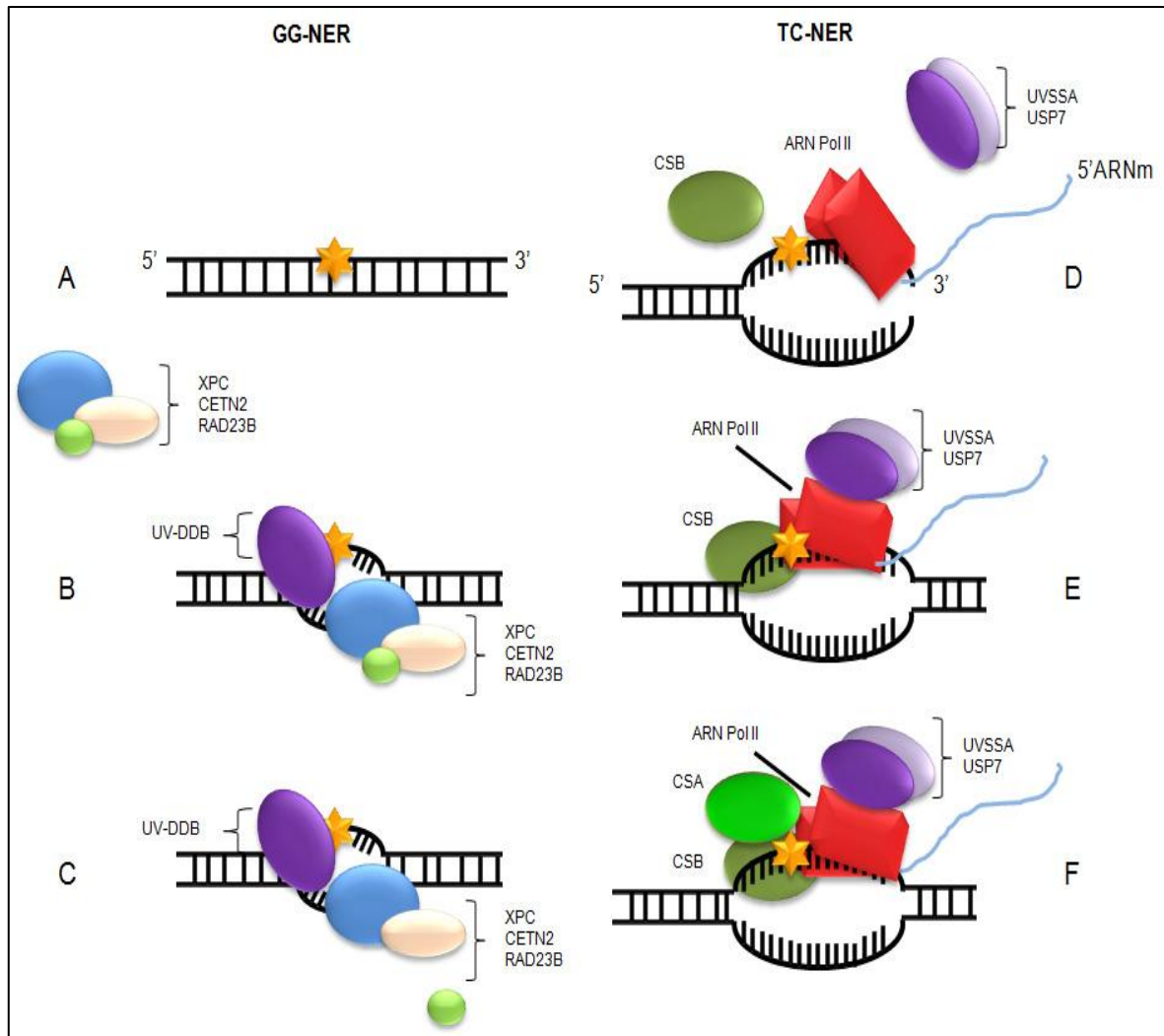


Figure 3. Schéma de l'étape de reconnaissance dans le mécanisme de réparation par excision de nucléotide « GG-NER » et « TC-NER ». (A-C) Mécanisme de la « GG-NER ». (A) Reconnaissance du dommage par le complexe XPC/CETN2/RAD23B. (B) Recrutement du complexe UV-DDB pour former le complexe de reconnaissance. (C) Décrochage de la protéine RAD23B. (D-F) Mécanisme de la « TC-NER ». (D) Elongation du transcrit par l'ARN Pol II associée aux protéines UV-SSA et USP7. (E) Reconnaissance d'un dommage au cours de la transcription et blocage de l'ARN Pol II. Renforcement de l'interaction avec la protéine CSB*. (F) Recrutement de la protéine CSA pour former le complexe CSA-CSB*.

Pour la TC-NER, les dommages sont indirectement reconnus au cours de la transcription suite à l'arrêt de l'ARN Pol II au niveau du dommage. En effet, au cours de l'élongation du transcrit, les protéines UV-SSA (*UV-stimulated scaffold protein A*), USP7 (*ubiquitin-specific-processing protease 7*) et CSB* (*Cockayne syndrome protein B*) interagissent avec l'ARN Pol II (Schwertman et al. 2012; Foustéri et al. 2006) (Figure 3D). Mais suite à un blocage de cette dernière au niveau de la lésion, l'affinité de la protéine CSB* pour l'ARN Pol II va augmenter (Figure 3E) et un complexe CSA/CSB* (*Cockayne syndrome WD repeat protein A and B*) va alors se former (Figure 3F).

Suite à cette première étape de reconnaissance des dommages, que ce soit pour la GG-NER ou la TC-NER, le complexe TFIIH (*Transcription factor IIH*) est recruté aux sites de lésion (Yokoi et al. 2000 ; Riedl, Hanaoka, and Egly 2003). Ce complexe est composé de dix sous-unités dont sept forment le cœur du complexe (XPD, XPB, p62, p52, p44, p34 and TTDA) et trois forment le sous-complexe CAK (*CDK-activating kinase*) composé des protéines CDK7 (*Cyclin-dependent kinase 7*), MAT1 (*CDK-activating kinase assembly factor MAT1*) et Cycline H. La protéine XPG va alors être recrutée et s'associer ou non au complexe TFIIH afin de former le complexe de pré-incision (Figure 4A) (Dunand-Sauthier et al. 2005; Ito et al. 2007; Zotter et al. 2006). Le sous-complexe CAK, présentant une activité hélicase au cours de la transcription, va alors se dissocier du complexe TFIIH (Coin et al. 2008). Les sous-unités XPB et XPD vont permettre l'ouverture de la double hélice d'ADN grâce à leur polarité opposée (Figure 4B) (Coin, Oksenyich, and Egly 2007; Tapias et al. 2004; Winkler et al. 2000). Les protéines XPA et RPA (*DNA-directed RNA polymerase I*) seront alors recrutées sur le brin endommagé et sur le brin complémentaire respectivement (de Laat et al. 1998) (Figures 4A-B). L'endonucléase spécifique de la structure hétérodimérique XPF/ERCC1 sera alors dirigée vers la protéine XPA sur le brin endommagé et ce par la protéine RPA dans le but de faire une incision du côté 5' de la lésion (Staresincic et al. 2009) (Figure 4B). Suite à cette incision, nommée « point de non-retour », XPG est activée pour couper le brin endommagé du côté 3'. Cela permet une excision d'une longueur de 22 à 30 nucléotides (Staresincic et al. 2009; Orelli et al. 2010)

(Figure 4C). La protéine PCNA est alors directement chargée après l'incision en 5' par le complexe XPF-ERCC1, permettant le recrutement de nombreuses protéines comme les ADN Pol- δ , Pol- κ ou Pol- ϵ pour compléter, par synthèse, la brèche (Figures 4C-D) (Ogi et al. 2010). La réaction de la NER est finalement complétée par la ligation des extrémités d'ADN par les ADN ligases 1 ou 3 (Moser et al. 2007) (Figure 4E).

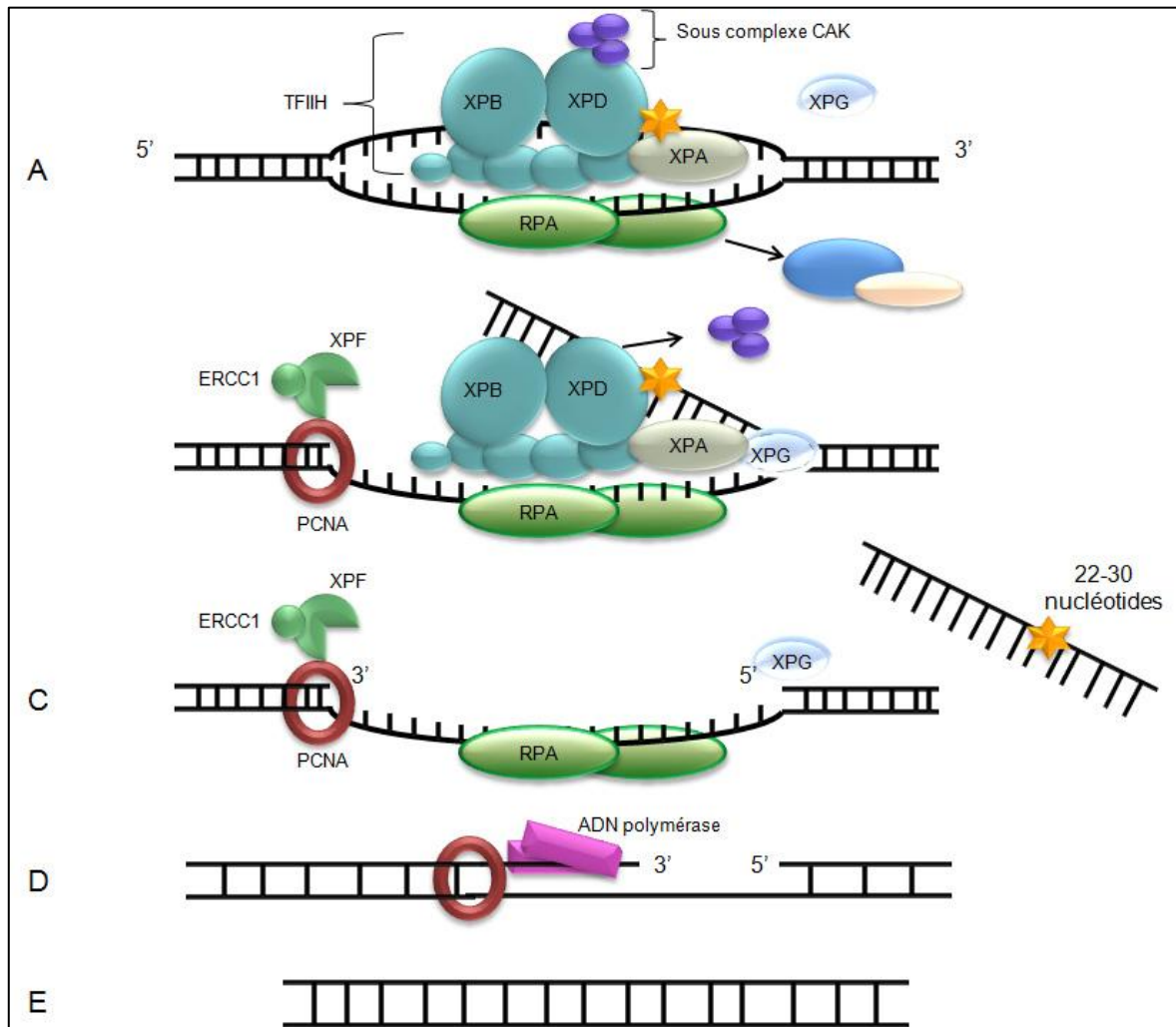


Figure 4. Schéma des étapes d'incision, d'élimination de la lésion et de ligation du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER). (A) Recrutement du complexe TFIID et des protéines XPA et RPA sur les brins endommagé et sain respectivement. Dissociation des protéines XPC et CETN2. Le sous-complexe CAC et la protéine XPD déroulent l'ADN. Recrutement de la protéine XPG pour former le complexe de pré-incision en 3'. (B) Recrutement du complexe XPF/ERCC1 du côté 5' et clivage de l'ADN : « point de non-retour ». Recrutement de la protéine PCNA. (C) Activation de l'activité endonucléasique de la protéine XPG en 3'. Élimination d'un fragment d'ADN de 22 à 30 nucléotides. (D) Recrutement de l'ADN polymérase par la protéine PCNA pour reconstituer un double brin d'ADN. (E) Ligation de l'ADN par l'ADN Ligase 1.

1.2.3 La réparation des mésappariements (MMR)

Des erreurs peuvent survenir au cours de la réplication de l'ADN. En effet, il n'est pas impossible de voir des insertions, des délétions ou un glissement d'un brin par rapport à l'autre, apparaître au cours de ce processus. Ceci peut entraîner un mésappariement et la formation d'une structure particulière au niveau de l'ADN appelée boucle d'insertion ou de délétion (*Insertion/Deletion Loop* ou IDL).

Suite à la présence de dommages (Figure 5A), les complexes MutS et MutL vont être activés : la protéine MSH2 va s'hétérodimériser avec MSH6 ou MSH3 pour former les complexes MutS α ou MutS β respectivement (Figure 5B) (Drummond et al. 1995; Li and Modrich 1995). Ces complexes sont des ATPases qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des mésappariements et dans l'initiation de la réparation (Tian, Gu, and Li 2009). Alors que le complexe MutS α reconnaît préférentiellement les mésappariements base-base et les insertions/délétions (ID) de 1 ou 2 nucléotides, MutS β va préférentiellement reconnaître des larges zones d'ID. Par la suite, la protéine MLH1 va s'hétérodimériser avec PMS2 pour former le complexe MutL α qui possède une activité ATPase (Figure 5B). Un défaut de son activité entraîne l'inactivation de la MMR dans les cellules humaines. La protéine PCNA va alors interagir avec les protéines MSH2 et MLH1, jouant un rôle dans l'initiation et dans les étapes de resynthèse de l'ADN (Umar et al. 1996; Gu et al. 1998). Elle interagit également avec MSH6 et MSH3 (Kleczkowska et al. 2001) via un motif d'interaction de PCNA conservé appelé le PIP box (Warbrick 2000) suggérant un rôle de PCNA dans la localisation de MutS α et MutS β aux sites de mésappariements dans les brins d'ADN nouvellement répliqués (Figure 5B) (Shell, Putnam, and Kolodner 2007; Lau and Kolodner 2003). Cependant, alors que PCNA est requise durant la MMR dirigée en 3', elle n'est pas essentielle au cours de la MMR dirigée en 5' (S. Guo et al. 2004). Cette observation pourrait être expliquée par le fait que la protéine EXO1, une exonucléase 5'-3' serait impliquée dans les deux processus. Cette protéine, comme PCNA, interagit avec les protéines MSH2 et MLH1 (Figure 5B) (Schmutte et al. 1998; Tishkoff et al. 1997, 1998; Tran et al. 2004). Une fois recrutée, EXO1 peut facilement effectuer une excision dirigée en 5' en présence de MutS α ou de MutS β et de RPA (Figure

5C) (Genschel and Modrich 2003; Tran et al. 2004). Son rôle dans la catalyse de l'excision dirigée en 3' nécessite l'endonucléase MutL α , dépendante des protéines PCNA et RFC (*Replication factor C*) (Dzantiev et al. 2004; Kadyrov et al. 2006) (Figure 5C).

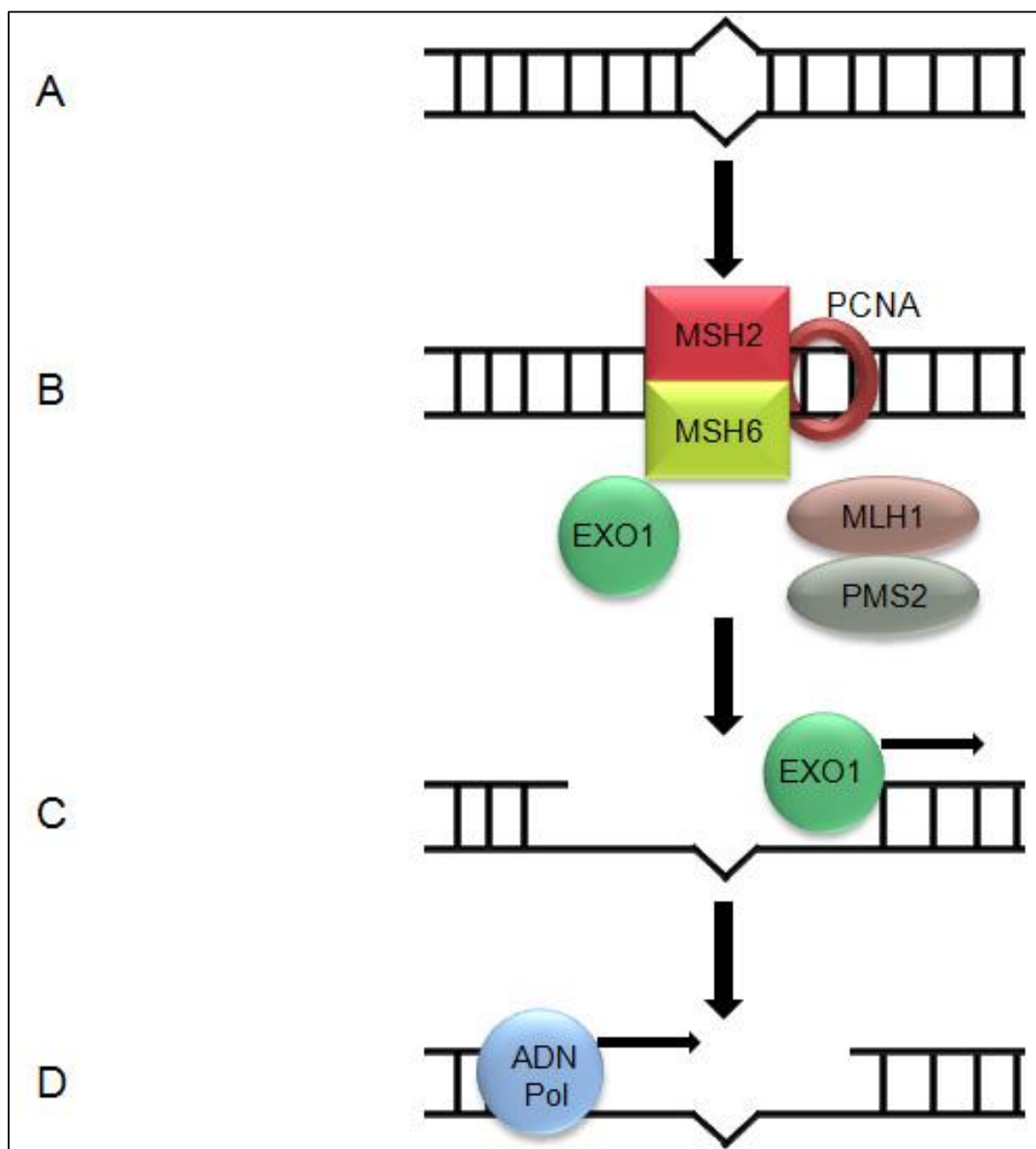


Figure 5. Schéma du mécanisme de la réparation des mésappariements (MMR). (A) Présence d'un dommage sur l'ADN. (B) Recrutement des protéines MSH2/MSH6 (complexe MutS α) sur le site de dommage puis des protéines MLH1 et PMS2 (complexe MutL α) et de la protéine EXO1. (C) Digestion du brin d'ADN par l'activité exonucléasique du complexe MutL α et EXO1. (D) Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase.

D'autres protéines seraient également impliquées dans la MMR comme les protéines RPA (*DNA-directed RNA polymerase I*), HMGB1 (*High mobility group protein B1*) et l'ADN Pol- δ . La protéine RPA semble être impliquée dans tous les stades de la MMR et se lierait même à la région endommagée avant MutS α et MutL α . Cette protéine protégerait la région de l'ADN présentant le simple brin généré pendant l'excision et faciliterait la resynthèse d'ADN (Dzantiev et al. 2004; Guo et al. 2006; Ramilo et al. 2002). Par la suite, l'ADN Pol- δ est recrutée permettant une resynthèse de l'ADN qui sera ligué par l'ADN ligase I menant ainsi à une réparation du double brin d'ADN (Figure 5D).

1.3 Les mécanismes de réparation des cassures double brin (CDB)

Parmi les nombreux types de dommage, les CDB sont les plus graves pour les cellules car elles peuvent entraîner l'entrée des cellules en apoptose. Suite à la détection de ces dommages, la cellule va activer deux mécanismes principaux : la cascade de signalisation de la DDR, permettant un arrêt du cycle cellulaire, et les mécanismes de réparation des CDB. Ces deux processus vont fonctionner de manière coordonnée pour permettre la réparation des CDB.

1.3.1 La cascade de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

En complément des mécanismes de réparation en tant que tels, la cascade de signalisation des dommages à l'ADN prend toute son importance. En effet, la réparation de l'ADN est fortement associée au cycle cellulaire et ses voies de signalisation vont ainsi permettre un ralentissement voire un arrêt du cycle. Ces arrêts vont survenir plus particulièrement aux étapes critiques du cycle cellulaire, soit avant ou pendant la réplication de l'ADN (arrêt en phase G1/S ou intra-S), soit juste avant la division cellulaire (arrêt en phase G2/M). Cette signalisation est complexe et extrêmement coordonnée car elle nécessite une synchronisation de nombreuses protéines ayant des fonctions différentes. Toutes ces protéines peuvent alors être catégorisées selon leur rôle et leur

ordre d'activation. Quatre niveaux d'organisation peuvent être distingués : les détecteurs de dommages, les transducteurs de signaux, les médiateurs et les effecteurs. En effet, la détection des CDB va se faire par des protéines détectrices comme le complexe Ku70-Ku80, le complexe MRN ou la protéine γ H2AX. Ces dernières vont permettre le recrutement de protéines transductrices de signaux de réparation dont les plus importantes sont les protéines ATM, ATR et DNA-PKcs. Cela va alors permettre l'activation de protéines médiatrices des signaux de la DDR, telles que les protéines CHK1 et CHK2 (*Checkpoint proteins 1 et 2*). Finalement, les protéines effectrices seront phosphorylées, notamment la protéine p53 ou les protéines jouant un rôle dans le cycle cellulaire telles que CDC25. L'ensemble de ces processus aboutira à un ralentissement ou à un possible arrêt du cycle cellulaire en G1/S, en intra-S ou en G2/M, arrêt nécessaire pour faciliter le processus de réparation de la double hélice d'ADN.

1.3.1.1 Les protéines de reconnaissance des cassures double brin

1.3.1.1.1 Le complexe Ku70/Ku80

Suite à la survenue de CDB, les extrémités libres de l'ADN peuvent être reconnues par les protéines Ku70 et Ku80 (Mimori, Hardin, and Steitz 1986; Jeggo et al. 1999). Ces protéines sont extrêmement abondantes dans la cellule et présentent une affinité très élevée pour l'ADN (J. Li and Stern 2005). Ce complexe Ku70-Ku80 forme un anneau symétrique qui va encercler l'ADN par contact direct avec la structure de l'ADN (Walker, Corpina, and Goldberg 2001). Les protéines Ku interagissent initialement avec les extrémités distales de l'ADN, protégeant ainsi ces extrémités, désormais libres, d'une résection aberrante par les exonucléases (Jovanovic and Dynan 2006; Meek, Dang, and Lees-Miller 2008). Les protéines Ku vont alors se déplacer le long de la molécule d'ADN (S. Yoo and Dynan 1999), entraînant ainsi le chargement de multiples complexes Ku le long de l'ADN, et permettant le recrutement de la sous-unité catalytique DNA-PKcs. Cette protéine perpétuera le signal de CDB (DNA-PKcs sera décrite plus loin).

1.3.1.1.2 La protéine H2AX

La phosphorylation de la protéine H2AX est un évènement de régulation crucial de la DDR. Ce variant d'histone H2AX est un membre de la famille des histones H2A participant à l'organisation de la chromatine autour des nucléosomes. La protéine H2AX se retrouve au centre du mécanisme de réponse aux CDB de la cellule, et plus précisément sa forme phosphorylée sur la Sérine 139, réputée pour être un marqueur spécifique des CDB (Rogakou et al. 1998, 1999). Les protéines membres de la superfamille des PIKK (*Phosphoinositol 3-kinase-related kinase*), dont font partie les protéines DNA-PKcs, ATM et ATR, sont responsables de cette phosphorylation bien que la protéine ATM soit considérée comme l'acteur principal (Bakkenist and Kastan 2003; Kastan and Lim 2000) et que son recrutement nécessite la présence de γ H2AX. Par ailleurs, alors que la phosphorylation de H2AX par ATM et DNA-PKcs se produit suite à la présence de CDB (H. Wang et al. 2005), la phosphorylation de H2AX par ATR survient principalement suite à un blocage de la fourche de réplication induit par un stress réplcatif (I M Ward and Chen 2001) ou par une exposition aux UV (Irene M Ward, Minn, and Chen 2004).

γ H2AX est également connue pour son accumulation aux sites de CDB (Paull et al. 2000). En effet, après la détection de CDB, il va y avoir une phosphorylation de proche en proche des protéines H2AX le long de l'ADN (Stucki et al. 2005). Cela entraîne la formation de « foyers » de protéines γ H2AX, éléments importants pour le recrutement de nombreux partenaires tels que le complexe MRN, les protéines TP53BP1 (Furuta et al. 2003) ou MDC1 (Stewart et al. 2003). Ces protéines vont alors colocaliser et interagir avec γ H2AX. Ce recrutement, particulièrement important, est permis par la présence de deux domaines d'interaction spécifiques chez les partenaires de γ H2AX impliqués dans la réponse aux CDB de l'ADN. Le domaine FHA (*Forkhead-associated*), qui reconnaît les résidus Thréonine phosphorylés dans une séquence spécifique (Durocher et al. 1999) et le double domaine consécutif BRCT (*BRCA1 C-terminal domain*) (Manke et al. 2003) vont se lier spécifiquement au domaine C-terminal de γ H2AX. Les protéines recrutées, comme par exemple la protéine MDC1 ou encore le complexe MRN (leurs rôles seront détaillés plus

loin), vont alors former des foyers aux sites de dommages et permettre le recrutement des protéines transductrices du signal de CDB permettant un arrêt du cycle cellulaire.

Néanmoins, H2AX peut également être phosphorylée sans nécessairement la présence de CDB. Il a été montré qu'une privation de sérum, qui ne cause pas de CDB, peut entraîner la présence de γ H2AX par l'intermédiaire de la voie p38-MAPK, voie généralement associée à l'entrée des cellules en apoptose (Lu et al. 2008). Ainsi l'observation de γ H2AX doit se faire avec précaution avant d'affirmer la présence de CDB au sein d'une cellule.

1.3.1.1.3 La protéine MDC1

La protéine MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) est une protéine déterminante dans le recrutement des facteurs de la DDR. Elle permet l'initiation du mécanisme de réparation et de la signalisation des CDB. MDC1 est une grande protéine adaptatrice requise aux sites de CDB et est recrutée sur γ H2AX. Suite à la phosphorylation de H2AX, les deux domaines consécutifs BRCT de MDC1 vont reconnaître la phosphorylation de H2AX sur la Sérine 139 et interagir avec le domaine C-terminal de γ H2AX (Stucki et al. 2005). Le recrutement et l'interaction entre γ H2AX et MDC1 va alors initier la première étape de reconnaissance de la signalisation des CDB. MDC1 est alors phosphorylée par la protéine CK2 (*Casein Kinase 2*), permettant son interaction avec NBS1 (membre du complexe MRN décrit plus loin) et ainsi le recrutement du complexe MRN (Goldberg et al. 2003). L'ensemble de ces partenaires va être nécessaire pour permettre le recrutement de la protéine ATM. Une boucle de rétrocontrôle positif va alors se mettre en place, générant une phosphorylation de H2AX sur plusieurs milliers de paires de base spécifiques de la formation des foyers nucléaires γ H2AX. MDC1 possède également un domaine FHA pour interagir avec la protéine ATM (Jungmichel et al. 2012), qui va phosphoryler MDC1 mais également permettre de phosphoryler CHK2 sur sa Thréonine 68 en réponse aux CDB (que nous détaillerons plus tard). Cette interaction est importante pour un arrêt du cycle cellulaire (Lou et al. 2003). Cela permet donc de faciliter le recrutement d'ATM aux sites de CDB et ainsi l'amplification du signal de dommage (Lou et

al. 2006). MDC1 serait également importante dans l'association entre TopBP1 et NBS1 (Choi and Yoo 2016) (interaction détaillée dans la partie suivante).

1.3.1.1.4 Le complexe MRN

Le complexe MRN est composé de trois protéines : MRE11 (*Meiotic Recombination 11 Homolog 1*), RAD50 (*RAD50 double strand break repair protein*) et NBS1. Ces protéines présentent des fonctions différentes mais s'associent pour être recrutées aux sites de CDB de l'ADN (Paull and Gellert 1999; Carney et al. 1998). Suite au recrutement de MDC1 sur γ H2AX en réponse à une CDB, MDC1 et TopBP1 vont permettre l'interaction avec le complexe MRN et plus particulièrement avec NBS1 (Choi and Yoo 2016). NBS1 va alors se localiser au foyer de dommages γ H2AX via ses domaines FHA et BRCT (Kobayashi et al. 2002). La protéine RAD50 va ensuite permettre l'association du complexe à l'ADN (Kinoshita et al. 2015) et la protéine MRE11, possédant des activités endonucléase simple brin et 3'-5' exonucléase double brin, va permettre une digestion des brins d'ADN au cours des mécanismes de réparation (Shibata et al. 2014; Paull and Gellert 1998). La protéine NBS1 permet également le recrutement de la protéine ATM activée aux sites de dommages via son domaine C-terminal (Zhongsheng You et al. 2005), bien qu'il semble que RAD50 soit également importante (J.-H. Lee and Paull 2005). Ce recrutement est indispensable car il permet une phosphorylation de H2AX prolongée le long de l'ADN par la protéine ATM et une activation des autres protéines de la cascade de signalisation par ATM.

1.3.1.2 Les transducteurs du signal des cassures double brin

La reconnaissance des CDB par les protéines décrites précédemment va permettre la transmission du signal des dommages à l'ADN via l'activation de trois protéines principales. Ces protéines appartiennent toutes les trois à la famille des PIKK : DNA-PK, ATM et ATR. Ces protéines vont pouvoir activer de nombreux substrats, parfois de façon redondante, afin de permettre un ralentissement voire l'arrêt du cycle cellulaire.

1.3.1.2.1 La protéine DNA-PKcs

Cette protéine est la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK, également composé de l'hétérodimère Ku70-Ku80, qui constitue la sous-unité régulatrice. En présence de CDB, DNA-PKcs va être phosphorylée sur sa Thréonine 2609 permettant son recrutement sur le complexe Ku70-Ku80 aux sites de CDB (D. W. Chan et al. 2002) (décrit précédemment). Ces protéines vont alors former le complexe DNA-PK (Rivera-Calzada et al. 2007). Cette sous-unité, outre son rôle dans le recrutement des protéines de préparation des extrémités libres d'ADN (qui sera détaillé plus loin), pourrait également avoir un rôle à jouer dans la signalisation des CDB. Pendant longtemps, DNA-PKcs s'est différenciée des autres protéines PIKK par l'absence de transduction du signal de CDB (Burma et al. 2001) bien qu'elle jouerait un rôle actif dans le mécanisme de réparation de la NHEJ (Uematsu et al. 2007) (mécanisme décrit plus loin). Cependant, il a été constaté une redondance de fonction entre DNA-PKcs et ATM sur la phosphorylation de H2AX en réponse à des RI. Ces phosphorylations par DNA-PKcs permettraient, en l'absence d'ATM, la rétention des protéines de réparation aux sites de CDB telles que TP53BP1 et MDC1 et un ralentissement du cycle cellulaire (Stiff et al. 2004). De plus, une étude a montré un défaut de phosphorylation de H2AX dans les lignées cellulaires de gliomes MO59J présentant une diminution de DNA-PKcs (Paull et al. 2000). Néanmoins, bien que DNA-PKcs puisse phosphoryler H2AX et CHK2 de manière redondante à ATM et qu'elle ne soit pas capable de phosphoryler d'autres substrats, cela souligne la spécificité de DNA-PKcs pour H2AX (J. Li and Stern 2005; M. Wang et al. 2006).

D'autres partenaires du complexe DNA-PK sont régulièrement découverts comme la protéine UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*), impliquée dans l'activation de DNA-PK (Zhao et al. 2012), ou encore BCLAF1 (*Bcl2-associated transcription factor 1*), qui stabilise le complexe Ku/DNA-PKcs (Y. Y. Lee et al. 2012).

1.3.1.2.2 La protéine ATM

Les CDB activent la protéine ATM qui sera recrutée au niveau des sites de dommages (Banin et al. 1998). ATM appartient à la famille des PIKK tout comme DNA-PKcs et ATR. Elle est présente dans la cellule sous la forme de dimère, mais en présence de CDB, elle se trans-phosphoryle sur sa Sérine 1981 pour former un monomère (Bakkenist and Kastan 2003). Cette monomérisation serait favorisée par la protéine Tip60 (Y. Sun et al. 2005), une acétyltransférase qui acétylerait ATM près de son domaine FATC (Yingli Sun et al. 2007). Elle est alors recrutée au niveau des sites de CDB par le complexe MRN et la protéine TopBP1. Cette association entre le complexe MRN et la protéine ATM va alors favoriser l'interaction de cette dernière pour ses substrats. ATM possède une activité de kinase ciblant principalement les sites ST/SQ (Ser/Thr-Glu sites) (Traven and Heierhorst 2005b) ce qui implique que cette protéine possède beaucoup de substrats tels que H2AX (Bakkenist and Kastan 2003; Kastan and Lim 2000), MDC1 (Jungmichel et al. 2012), P53 (Banin et al. 1998), BRCA1 (D Cortez et al. 1999), CHK2 (Matsuoka et al. 2000; Irene M. Ward, Wu, and Chen 2001) ou encore CHK1 (Gatei et al. 2003). Parmi ces substrats, plusieurs d'entre eux sont impliqués dans la signalisation menant à l'arrêt du cycle cellulaire comme les protéines CHK1, CHK2 ou P53. De plus, il apparaîtrait qu'ATM aurait des substrats dans le cytoplasme (Alexander et al. 2010).

1.3.1.2.3 La protéine ATR

Lors d'un stress réplcatif ou suite à la présence de dommages à l'ADN induisant un blocage de la réplication comme ceux induits par des UV, l'ADN polymérase va se dissocier du complexe de réplication générant l'apparition d'un simple brin d'ADN (Byun et al. 2005). Lorsqu'un simple brin d'ADN est disponible, il est alors reconnu par la protéine RPA qui, par l'intermédiaire de sa sous-unité RPA1 70kD (Zou and Elledge 2003), va recruter la protéine ATRIP (*ATR interacting protein*), un partenaire direct d'ATR. La protéine ATR (*Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related*) va donc former un complexe stable avec la protéine ATRIP (D. Cortez et al. 2001). De plus, ATR peut également être activée au cours de la réponse à des CDB et plus particulièrement lorsqu'un simple brin d'ADN est

généré suite à la résection du second brin par nucléolyse en réponse à des CDB (Zou and Elledge 2003). ATR, comme les deux autres protéines décrites précédemment, appartient à la famille des PIKK. Elle a la capacité d'activer plusieurs substrats suite à son recrutement et plus particulièrement la protéine CHK1 grâce à l'action de deux protéines médiatrices, TopBP1 (Kumagai et al. 2006; Mordes et al. 2008) et la Claspine (Kumagai and Dunphy 2003b). Alors que TopBP1 est recrutée sur le complexe simple brin ADN-RPA (Delacroix et al. 2007), la Claspine subit une phosphorylation lui permettant de lier la protéine CHK1 (S.-Y. Jeong et al. 2003) et va servir de plateforme pour les activations et les phosphorylations médiées par la protéine ATR (Guo et al. 2000; Kumagai and William G. Dunphy 2003).

1.3.1.3 Les médiateurs du signal des cassures double brin

1.3.1.3.1 *La protéine CHK2*

ATM est connue pour cibler les domaines SQ/TQ comme ceux retrouvés dans la partie N-terminale de la protéine CHK2 au niveau de la Thréonine 68 (Chaturvedi et al. 1999; J. Y. Ahn et al. 2000). Une fois phosphorylé, le motif SQ/TQ de la protéine CHK2 est reconnu par le domaine FHA d'une autre protéine CHK2 (Matsuoka et al. 2000; Cai, Chehab, and Pavletich 2009). Cette reconnaissance entre les deux motifs entraîne une homodimérisation, la formation d'une boucle de phosphorylation activatrice intramoléculaire et une activation complète de la protéine. Une fois activée, CHK2 est alors dissociée des sites de dommages et dispersée en tant que monomère dans le noyau pour agir sur de multiples substrats impliqués dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription de gènes. CHK2 peut également être phosphorylée par ATR et DNA-PK (X. Q. Wang et al. 2006). Les substrats de CHK2 incluent le gène suppresseur de tumeur P53 (Hirao et al. 2000), la famille des phosphatases CDC25 (J. Ahn and Prives 2002; J Falck et al. 2001) ou encore le gène suppresseur de tumeur BRCA1 (J. Zhang et al. 2004).

1.3.1.3.2 La protéine CHK1

La protéine CHK1 peut être recrutée par la forme phosphorylée de la Claspine (Seong-Yun Jeong et al. 2003) au complexe simple brin d'ADN-RPA apportant alors CHK1 à proximité de la protéine ATR active (Kumagai and Dunphy 2003a). CHK1 est phosphorylée par ATR sur de multiples sites SQ/TQ dans les domaines régulateurs C-terminaux, dont les Sérines S317 et S345, considérées comme des marqueurs d'activation. La phosphorylation de ces sites est essentielle pour l'activité biologique de CHK1 (Niida et al. 2007). La phosphorylation par ATR permet de stimuler l'activité kinase de CHK1 en levant l'inhibition de la protéine par son domaine régulateur C-terminal (M. Walker et al. 2009). De plus, cette phosphorylation semble promouvoir la relâche de CHK1 de la chromatine (Smits, Reaper, and Jackson 2006). Il a été suggéré qu'une interaction avec la protéine MCM3 (*Minichromosome maintenance 3*) serait nécessaire pour sa phosphorylation sur la Sérine 345 (Xiangzi Han et al. 2014). Une fois activée, CHK1 se dissocie de la Claspine pour aller agir sur les substrats nucléaires et cytoplasmiques (Lukas et al. 2003). Parmi les substrats importants de CHK1, on retrouve des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire incluant les régulateurs positifs et négatifs telles que les protéines CDC25A (Jacob Falck et al. 2002) ou CDC25C (Blasina et al. 1999; Peng et al. 1997; Sanchez et al. 1997).

Suite à l'activation des protéines de point de contrôle CHK1 et CHK2, plusieurs substrats communs sont activés, entraînant un arrêt du cycle cellulaire. Il existe trois substrats principaux recrutés en fonction du type de dommages ou du point d'arrêt dans le cycle cellulaire. En effet, suite à des CDB, la protéine P53 peut être phosphorylée sur sa Sérine 15 directement par ATM et sur sa Sérine 20 par CHK2 (Hirao et al. 2000). P53, par l'intermédiaire de la protéine P21, va permettre l'arrêt de la cellule en phase G1 et/ou S (Di Leonardo et al. 1994; el-Deiry et al. 1994, 1993; Xiong, Zhang, and Beach 1993). La phosphorylation de CDC25A cible la protéine pour qu'elle soit dégradée alors que la protéine CDC25C est séquestrée dans une forme inactive par son association avec les protéines 14-3-3 (C.-Y. Peng et al. 1997). Ces protéines permettent ainsi un arrêt des cellules en phase G1/S et intra-S pour CDC25A et en G2 pour CDC25C (Figure 6).

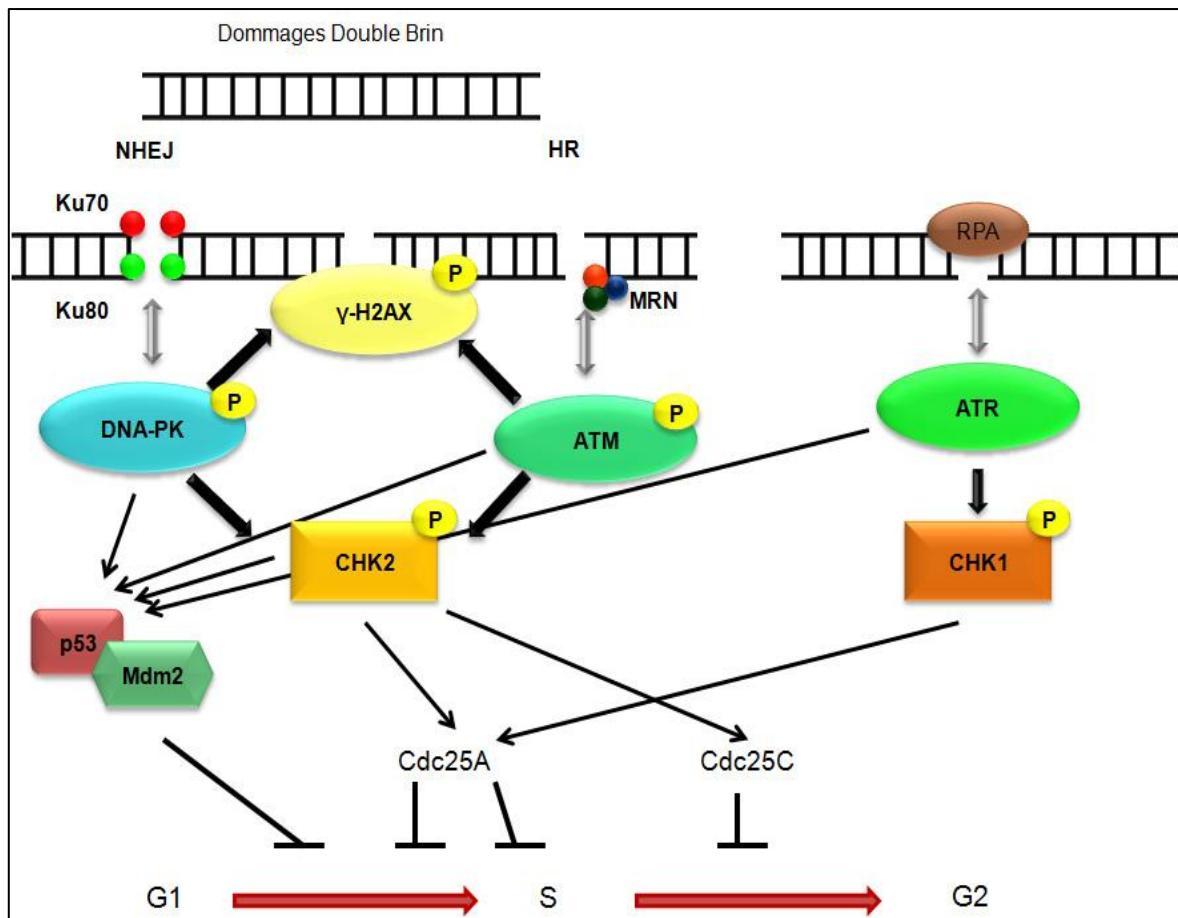


Figure 6. Schéma des mécanismes de la signalisation des dommages à l'ADN (non exhaustif). La présence de CDB active le recrutement des protéines de reconnaissance Ku70/Ku80 ou le complexe MRN. Cela permet l'activation de DNA-PK ou ATM qui vont alors pouvoir phosphoryler H2AX et CHK2. La présence d'un simple brin d'ADN entraîne le recrutement de RPA, qui permet l'activation d'ATR puis de CHK1. Toutes ces protéines vont cibler les protéines effectrices telles que P53 et les protéines CDC25.

1.3.2 La réparation des cassures double brin de l'ADN

En parallèle de la signalisation des CDB, les mécanismes de réparation vont être activés. Ces derniers sont subdivisés en deux grands mécanismes canoniques : la NHEJ ou la HR. Ces mécanismes sont différents au point de vue mécanistique et n'agissent pas au même moment du cycle cellulaire.

1.3.2.1 La réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues (NHEJ)

La NHEJ possède une grande capacité de réparation. Il en existe deux sortes : la NHEJ classique (c-NHEJ) et la NHEJ alternative (alt-NHEJ). La c-NHEJ est le mécanisme de

réparation majeur des CDB de l'ADN. Elle a la particularité de pouvoir intervenir à tout moment du cycle cellulaire mais préférentiellement au cours de la phase G0/G1. Cependant il apparaîtrait qu'en réponse aux RI, la NHEJ intervienne au cours de la phase G2 (Beucher et al. 2009).

1.3.2.1.1 Mécanisme de réparation de la NHEJ classique

La NHEJ classique peut être décrite selon trois étapes distinctes : une étape de reconnaissance, une étape de préparation et une étape de ligation des sites de CDB. La première étape permet le recrutement de protéines de reconnaissance et de préparation de l'ADN endommagé. Suite à cette première étape, les protéines vont alors traiter l'ADN et favoriser la juxtaposition des brins d'ADN libres, facilitant ainsi la ligation constituant la troisième étape de la réparation.

1.3.2.1.1.1 Etape 1 : Reconnaissance des CDB

Suite à la survenue de CDB (Figure 7A), les extrémités libres de l'ADN sont reconnues par le complexe hétérodimérique Ku70-Ku80 (Jeggo et al. 1999) qui va alors recruter la sous-unité catalytique DNA-PKcs (Figure 7B) (Chan et al. 2002; Calsou et al. 2003). Suite à la formation du complexe DNA-PK, DNA-PKcs va alors être activée par autophosphorylation ou occasionnellement par phosphorylation par ATM et/ou ATR sur des résidus Sérine et Thréonine. Cette activation de DNA-PKcs va faciliter le recrutement et la phosphorylation des enzymes de préparation et de ligation de l'ADN aux sites de dommage (Yajima et al. 2009; B. P. C. Chen et al. 2006). Cette autophosphorylation serait à l'origine d'un changement structural de l'holoenzyme mais permettrait également une régulation fine de l'accès à l'ADN pour les enzymes de préparation de l'ADN (Dobbs, Tainer, and Lees-Miller 2010; Neal and Meek 2011). Par ailleurs, cette autophosphorylation est nécessaire pour la continuation de la NHEJ car elle va entraîner le relargage de DNA-PKcs de l'ADN, permettant ainsi aux autres protéines impliquées dans la NHEJ de procéder (Hammel et al. 2010). Cette régulation pourrait limiter la réparation non sécuritaire des CDB à travers la HR en dehors de la phase S/G2 par exemple (Shrivastav, De Haro, and Nickoloff 2008; Jessica A. Neal and Meek 2011). Plusieurs substrats ont été

identifiés telles que les protéines Ku (Doug W. Chan et al. 1999), Artémis (*DNA cross-link repair 1C protein*) (Y. Ma et al. 2005), XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) (K.-J. Lee et al. 2004), l'ADN ligase IV (Y.-G. Wang et al. 2004) et XLF (*XRCC4-like factor*) (YU et al. 2008).

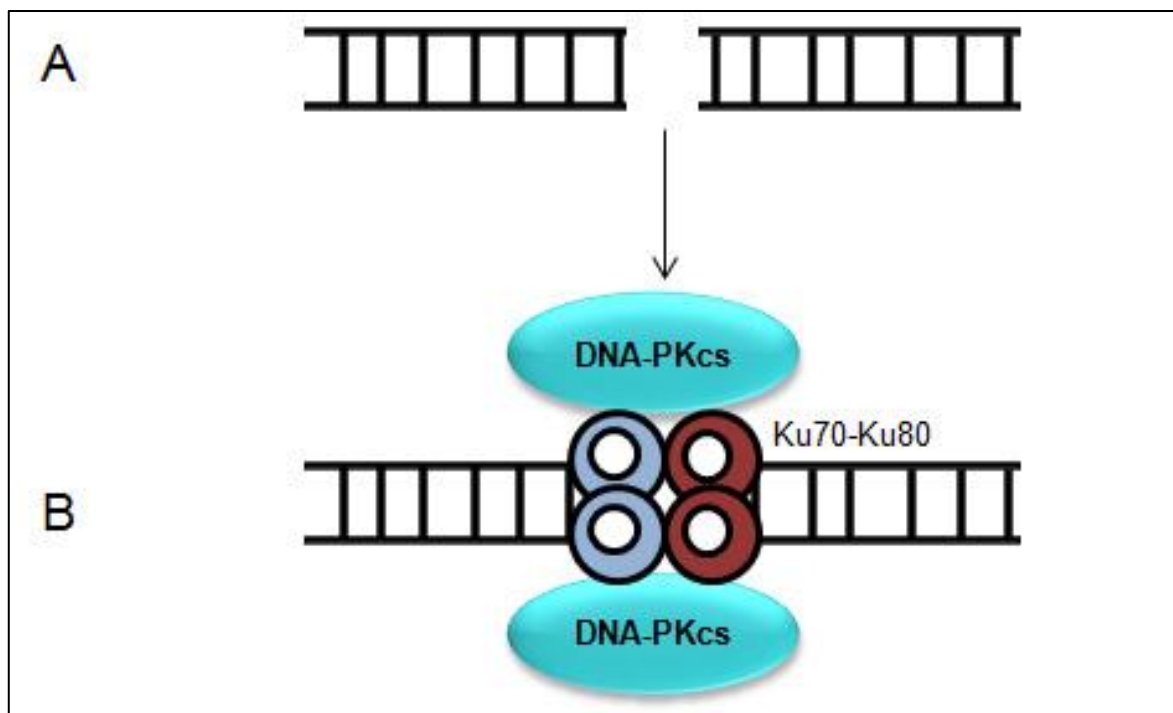


Figure 7. Schéma de l'étape de reconnaissance de la NHEJ. Lors de la survenue d'une CDB (A), celle-ci va être reconnue par l'hétérodimère Ku70/Ku80 permettant le recrutement de la sous-unité catalytique DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK (B).

1.3.2.1.1.2 Etape 2 : Préparation de l'ADN

Dans des conditions optimales, les extrémités d'ADN libres, alignées, compatibles et possédant un phosphate ou un hydroxyle en 5' ou en 3' respectivement, peuvent directement être liguées par la c-NHEJ. Néanmoins, dans des conditions moins adéquates, les extrémités d'ADN nécessitent une préparation à la ligation. En effet, ces bouts d'ADN, produits suite à des irradiations ou après une attaque par des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive oxygen species* ou ROS), ne peuvent pas être ligués directement. Ce processus requiert des enzymes supplémentaires pour préparer les extrémités libres de l'ADN. Une de ces enzymes est la protéine Artémis dont l'activité endonucléasique est stimulée par

DNA-PKcs pour éliminer les protubérances issues des extrémités libres simple brin d'ADN nouvellement formées (Figure 8B) (Yunmei Ma et al. 2002). D'autres enzymes de préparation telles que les protéines WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*) (Otsuki et al. 2007; Yannone et al. 2001; Lishan Chen et al. 2003) ou APLF (*Aprataxin and PNK-like factor*) (Grundy et al. 2013) participent également à la NHEJ.

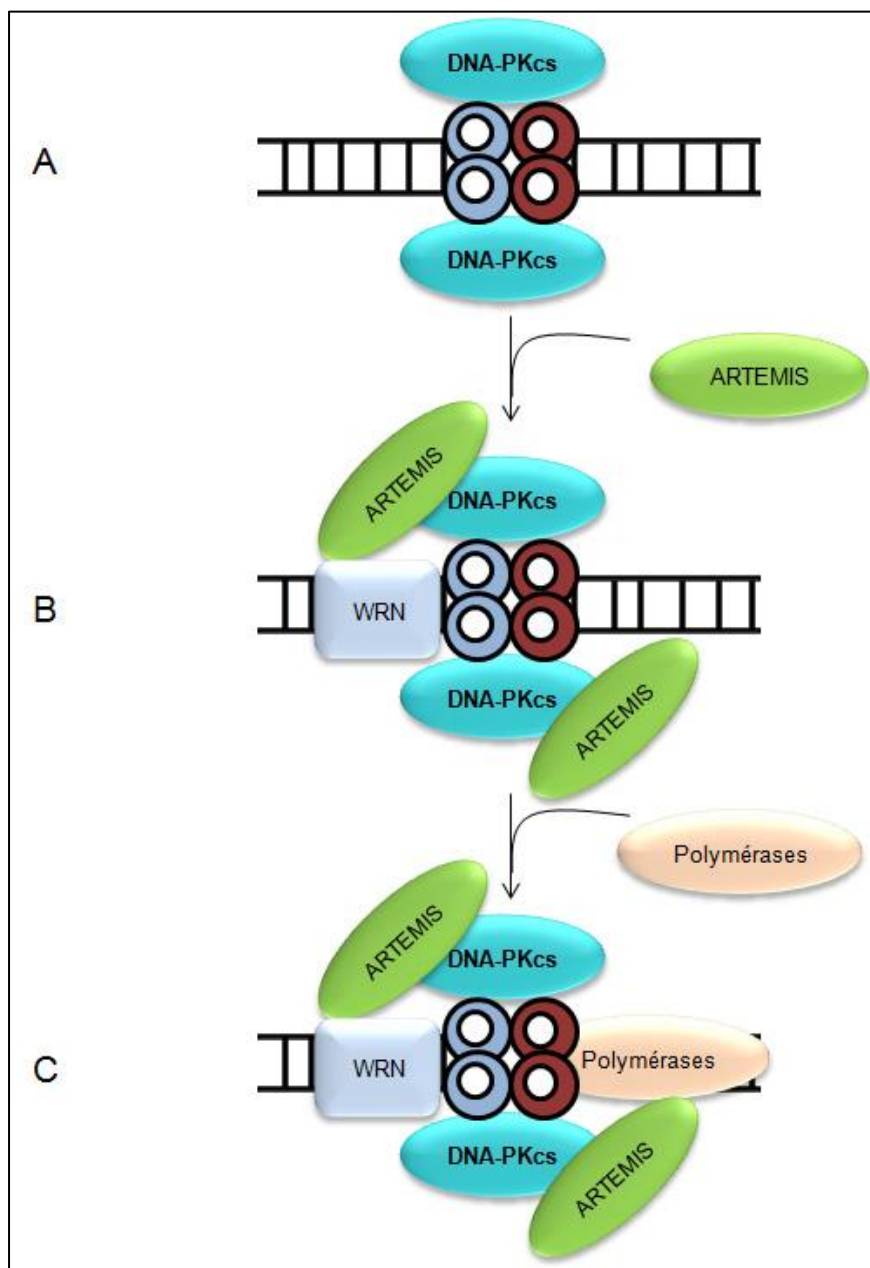


Figure 8. Schéma de l'étape de préparation de l'ADN lors de la NHEJ classique. Le complexe DNA-PK (**A**) recrute les protéines Artémis et WRN (**B**) pour former un complexe afin de préparer les extrémités de l'ADN avant que les ADN polymérases synthétisent un nouveau brin d'ADN (**C**).

Parmi les activités de préparation effectuées lors de la NHEJ, il y a également une étape d'extension réalisée par les ADN polymérases (Figure 8C). Celles-ci sont catégorisées en quatre classes : A, B, X et Y (Burgers et al. 2001). Trois membres de la famille de l'ADN polymérase X sont associés à la NHEJ : ADN Pol- γ , ADN Pol- μ et ADN Pol-TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*). Toutes ces polymérases présentent un domaine BRCT essentiel à la formation d'un complexe entre les membres de la polymérase X et les autres protéines de la NHEJ, aux abords de l'ADN endommagé (Ramsden 2011).

1.3.2.1.1.3 Etape 3 : Ligation des deux brins d'ADN

La dernière étape de la c-NHEJ correspond à la jonction des extrémités d'ADN par le complexe ADN/XRCC4/ADN Ligase IV/XLF. En présence des protéines Ku, ce complexe a la particularité de pouvoir liguer deux brins d'ADN issus d'une CDB. Suite au processus de préparation des extrémités libres d'ADN entourant les CDB, les protéines XRCC4, XLF et ADN ligase IV vont former un complexe aux sites de CDB permettant de lier les brins d'ADN (Strande et al. 2012; Mahaney, Meek, and Lees-Miller 2009). Dans un premier temps, XLF, élément essentiel pour l'activité des ADN Pol- γ et Pol- μ , va jouer un rôle dans l'alignement des deux extrémités d'ADN au sein du complexe de ligation, facilitant ainsi le processus de liaison (Figure 9B) (Akopiants et al. 2009). En parallèle, la protéine XRCC4 va interagir avec la protéine PNKP (*Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase*) (Karimi-Busheri et al. 2007). Cette enzyme bi-fonctionnelle phosphoryle l'extrémité 5'-OH et déphosphoryle l'extrémité 3'-P favorisant ainsi la ligation de l'ADN grâce à une association chimique idéale (Chappell et al. 2002). Par la suite, l'ADN Ligase IV va interagir avec l'hélice α de la protéine XRCC4 par l'intermédiaire d'une région comprise entre deux domaines BRCT en C-terminal (Q. Wu et al. 2011). Cette liaison va permettre la stabilisation de l'ADN Ligase IV et stimuler son activité ligase (Nick McElhinny et al. 2000; Grawunder et al. 1998). De plus, des analyses structurales ont suggéré que ce complexe pourrait former une structure filamenteuse facilitant le lien entre les deux bouts d'ADN (Andres et al. 2012, 2007). Ainsi, le complexe XRCC4/ADN Ligase IV participerait, au cours du mécanisme de réparation, au maintien de la stabilité des extrémités d'ADN libres (L.

Chen et al. 2000). Cette fonction de stabilisation, commune à d'autres protéines accessoires, est particulièrement importante pour une réparation complète et sécuritaire des CDB par la c-NHEJ.

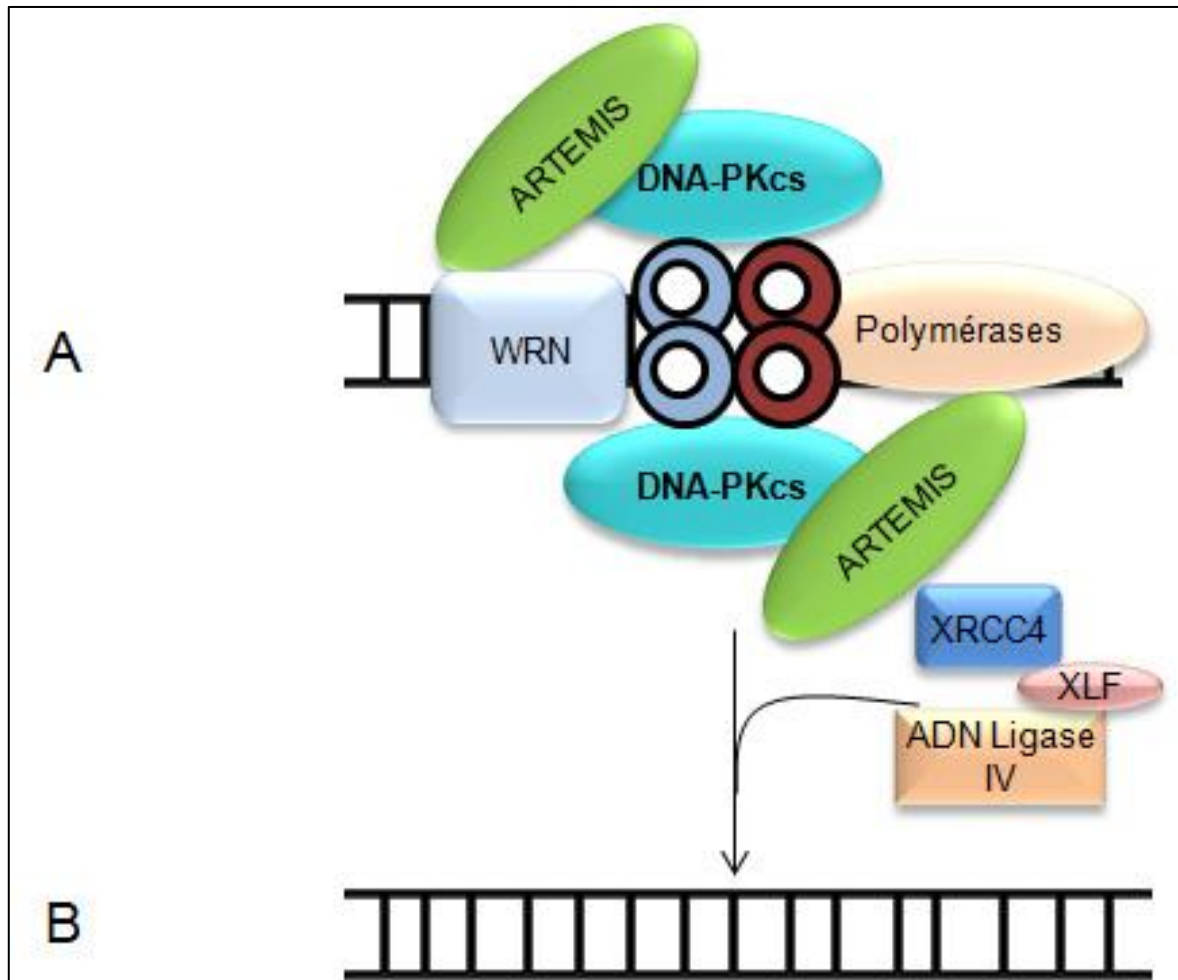


Figure 9. Schéma de l'étape de ligation des deux brins d'ADN lors de la NHEJ classique. (A) Suite à la préparation des extrémités libres d'ADN suivie de l'activité des polymérases, le complexe XLF/XRCC4/ADN Ligase 3 est recruté **(B)** pour permettre une ligation des deux extrémités d'ADN.

1.3.2.1.2 Mécanisme de réparation de la NHEJ alternative

En parallèle de la voie classique de la NHEJ, plusieurs sous-mécanismes peuvent être activés pour réparer les CDB : il s'agit de la NHEJ alternative (alt-NHEJ). Néanmoins, un mécanisme en particulier est mis en avant, la MMEJ (*Microhomology-mediated end joining*). Actif en présence ou en absence de la c-NHEJ, ce mécanisme nécessite la

présence de protéines qui vont reconnaître les CDB (Figure 10A) (Audebert, Salles, and Calsou 2004) et les exciser via des nucléases favorisant un alignement 5'-3' chimiquement correct, ainsi que des protéines permettant la ligation des brins d'ADN. Son processus d'activation nécessite cependant une meilleure compréhension.

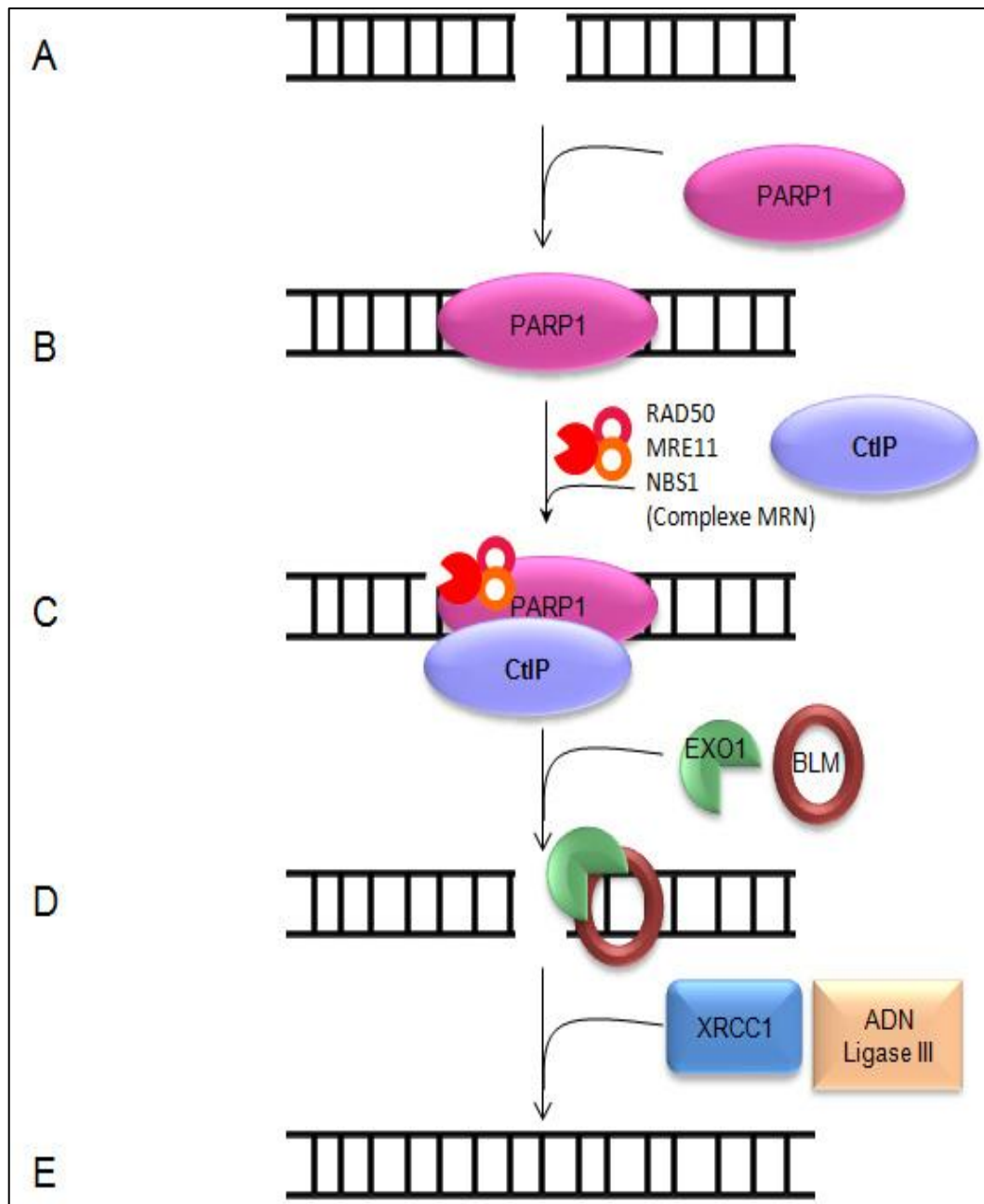


Figure 10. Schéma du mécanisme de la NHEJ alternative. Les CDB (A) sont reconnues par la protéine PARP1 (B). Le complexe MRN et la protéine CtIP (C) vont venir se fixer aux extrémités libres de l'ADN avant le recrutement des protéines Exo1 et BLM (D) pour agrandir la brèche. Les protéines XRCC1/Lig3 vont alors liguer les deux brins d'ADN (E).

Une des premières protéines recrutées est la protéine PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) (Figure 10B) (M. Wang et al. 2006). Cette protéine appartient à la famille du même nom et est responsable de la modification post-traductionnelle de poly-ADP ribosylation. PARP1 est impliquée dans de nombreux processus biologiques et agirait en compétition avec le complexe Ku70-Ku80 dans la reconnaissance des CDB (M. Wang et al. 2006) mais n'interviendrait pas dans la signalisation de ces dernières. Par la suite, le complexe MRN (Xie, Kwok, and Scully 2009) est recruté ainsi que la protéine CtIP (*CtBP-interacting protein*) (Yu Zhang and Jasin 2011) (Figure 10C) aux extrémités désormais libres de l'ADN. Ces protéines vont permettre une résection 5'-3' de l'ADN, permettant le recrutement des protéines BLM (*Bloom syndrome protein*) et EXO1 pour agrandir la brèche (Figure 10D) (A. V. Nimonkar et al. 2011). L'ADN polymérase θ va alors permettre de synthétiser l'ADN (Mateos-Gomez et al. 2015) et le complexe XRCC1/ADN ligase 3 sera recruté pour permettre la ligation des deux brins d'ADN (Figure 10E) (Marc Audebert, Salles, and Calsou 2004). L'ADN ligase 1 (Paul et al. 2013) peut également être recrutée bien que la ligase 3 semble la plus efficace (Simsek et al. 2011).

1.3.2.2 La réparation par Recombinaison Homologue (HR)

Un second mécanisme majeur peut intervenir suite à la présence de CDB dans la cellule : c'est la HR. Ce mécanisme de réparation intervient sur les CDB en utilisant la séquence homologue présente dans le génome. Ce mécanisme a la particularité de n'intervenir principalement qu'au cours des phases S et G2 et sa régulation est la clé pour le maintien de l'intégrité génomique. L'initiation de la HR va commencer avec la reconnaissance des CDB (Figure 11A) (Carney et al. 1998; Paull and Gellert 1999). Cette reconnaissance est effectuée par le complexe MRN (Figure 11B) et va permettre en partenariat avec les protéines TopBP1 et MDC1 (Figure 11C) (Choi and Yoo 2016) le recrutement de la protéine ATM aux sites de CDB (Figure 11D) (J.-H. Lee and Paull 2005; Uziel et al. 2003; Zhongsheng You et al. 2005). Cette dernière permettra la phosphorylation de H2AX de proche en proche pour la formation de foyers nucléaires (Figure 11E) (Paull et al. 2000; Stucki et al. 2005).

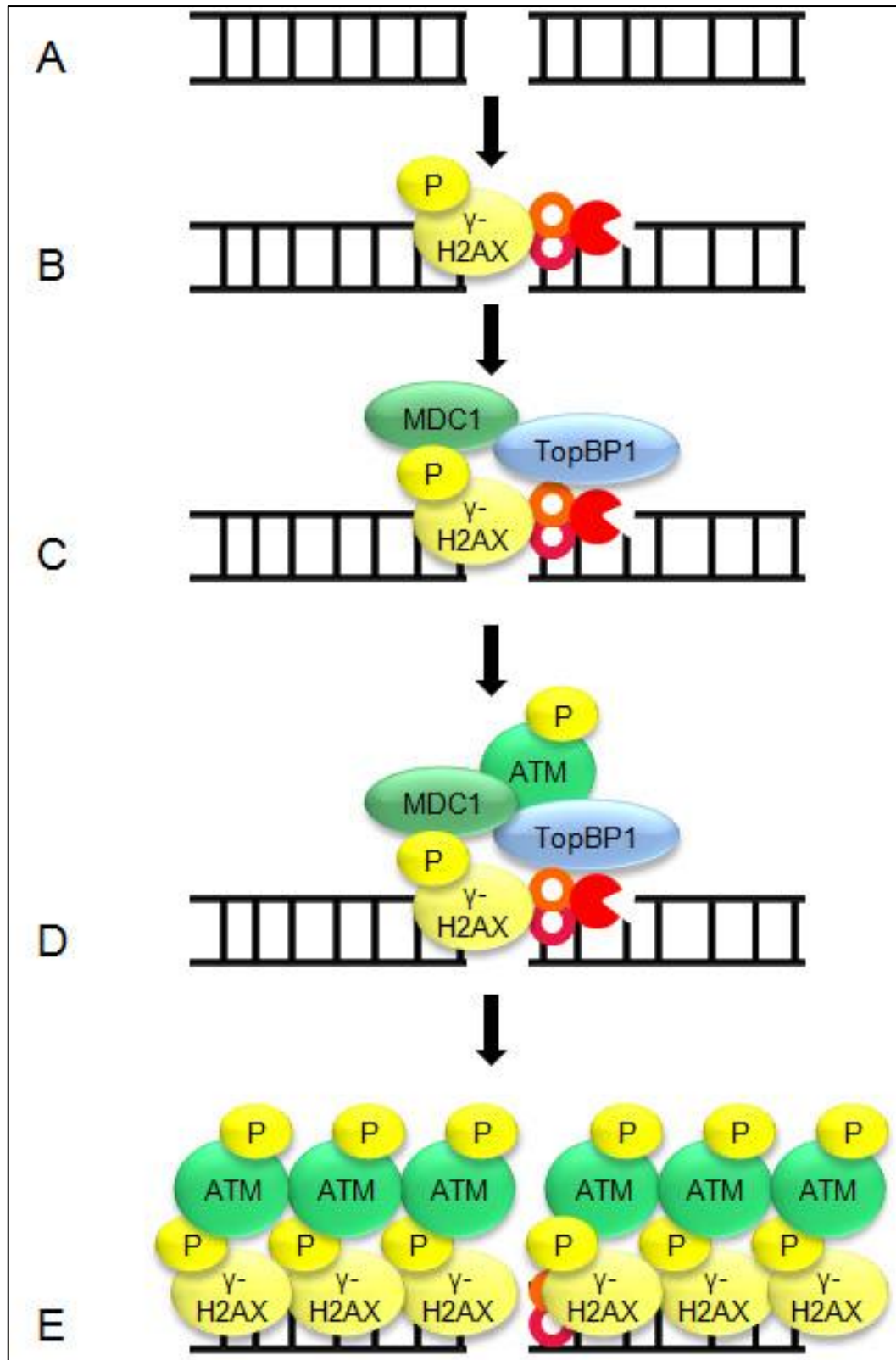


Figure 11. Schéma de l'initiation de la Recombinaison Homologue. Les CDB (A) sont reconnues par le complexe MRN (B) puis les protéines MDC1 et TopBP1 sont recrutées aux sites de CDB (C). ATM est alors activée (D) et permet l'amplification du signal pour la formation de foyers nucléaires (E).

ATM va alors pouvoir phosphoryler, entre autres, NBS1 (E. Y.-H. P. Lee et al. 2000), BRCA1 (D Cortez et al. 1999), mais également CHK2 (Irene M. Ward, Wu, and Chen 2001), pour activer la voie de signalisation des dommages à l'ADN menant à l'arrêt du cycle cellulaire. La phosphorylation de NBS1 va permettre au complexe MRN de préparer les extrémités 5' et 3' de l'ADN notamment grâce à l'activité exonucléasique de MRE11 (Shibata et al. 2014).

En effet, ce complexe, associé à d'autres protéines telles que l'exonucléase 1 (EXO1), va digérer un des deux brins d'ADN entourant la CDB de 5' vers 3' et ainsi permettre la suite de la HR (Liao et al. 2012). En parallèle, plusieurs phosphorylations vont s'opérer sur BRCA1 et plus particulièrement sur la Sérine 1387 par ATM (D Cortez et al. 1999) ou la Sérine 988 par CHK2 (J. Zhang et al. 2004; J.-S. Lee et al. 2000). BRCA1 lie directement l'ADN et permet l'initiation de la HR et la réparation des CDB (Figure 12B). BRCA1 est également impliquée dans l'inhibition de l'activité de MRE11 (Paull et al. 2001), ce qui permet de réguler la longueur de résection des brins d'ADN et de participer au traitement des extrémités libres d'ADN.

Par la suite, le fragment d'ADN 3' simple brin va être lié par RPA (Figure 12A) (Perrault et al. 2001). Cette protéine, importante dans la réparation ainsi qu'au niveau des fourches de réplication arrêtées lors du processus de la HR, est une protéine hétérotrimérique composée des sous-unités RPA1, RPA2 et RPA3 (Oakley et al. 2003). Sa déplétion peut entraîner une absence de réparation prolongée des CDB (Zou and Elledge 2003). Suite à la détection de ces dernières, RPA va être recrutée au niveau des foyers nucléaires et va se lier à l'ADN (Golub et al. 1998). Les protéines de la famille des PIKKs et Cyclin-CDK2 (*Cyclin dependant kinase 2*) vont alors participer à la régulation de la protéine RPA via la phosphorylation de sa sous-unité RPA2 en N-terminal (Oakley et al. 2003). RPA phosphorylée va être déplacée par la protéine RAD52 (*DNA repair protein RAD52 homolog*) permettant ainsi la liaison de la protéine RAD51 (*DNA repair protein RAD51 homolog 1*) sur le brin non digéré par le complexe MRN (Figure 12C) (Sugiyama and Kowalczykowski 2002). Dans ces conditions, la protéine RPA hyperphosphorylée, va

ralentir le mécanisme de réplication de l'ADN mais va grandement contribuer au processus de réparation de l'ADN.

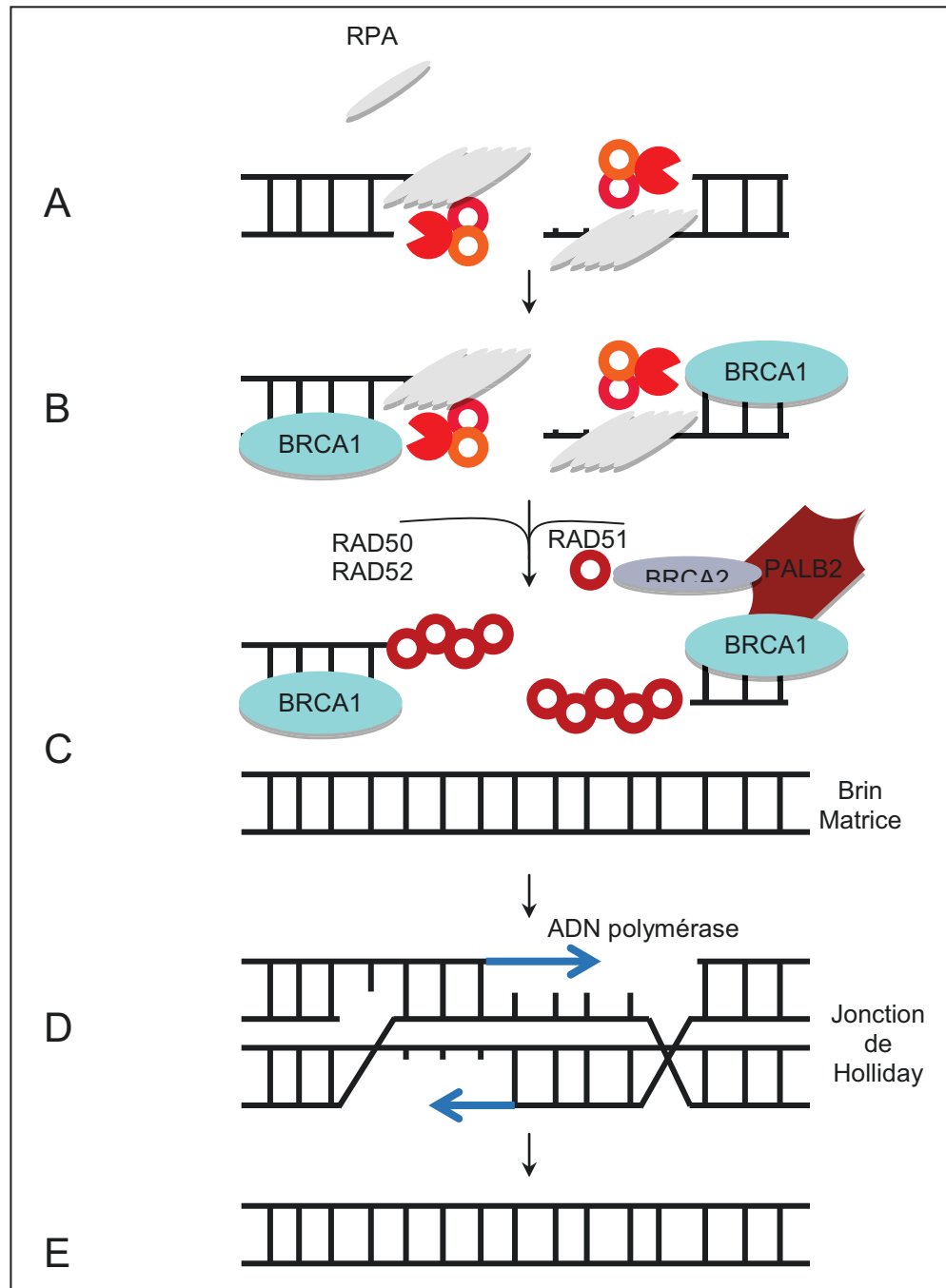


Figure 12. Schéma de la suite du mécanisme de la Recombinaison Homologue. (A) Digestion d'un des 2 brins d'ADN par le complexe MRN, le simple brin restant est protégé par la protéine RPA. (B) BRCA1 est recrutée aux sites de CDB pour permettre la régulation et la localisation de Rad51. (C) Rad52 va permettre de déplacer RPA pour que Rad51 prenne sa place. Le brin d'ADN homologue est alors recruté. (D) L'invasion du brin matrice va permettre la formation de Jonctions de Holliday (HJ) suivie d'une synthèse d'ADN par des ADN polymérases. (E) Résolution des HJ pour obtenir un brin d'ADN réparé.

Une deuxième protéine de la famille de BRCA1 va également jouer un rôle dans la HR. La protéine BRCA2 va lier la protéine BRCA1 par l'intermédiaire de la protéine PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*). Ces trois protéines vont alors former le complexe BRCA qui est extrêmement important dans la HR (Sy et al. 2009). Cette interaction entre PALB2 et BRCA2 (Hartford et al. 2016) va permettre son recrutement aux sites de CDB en même temps que les protéines BRCA1 et Rad51 (Scully et al. 1997). En effet, cette protéine BRCA2 est connue pour interagir directement avec la protéine RAD51 et réguler l'activité et la localisation de cette dernière (Davies et al. 2001; Esashi et al. 2005; Moynahan, Pierce, and Jasin 2001). En effet, la Sérine 3291 située dans la région C-terminale de BRCA2 est phosphorylée par des CDK, bloquant ainsi les interactions existantes entre les protéines BRCA2 et RAD51. RAD51 est alors activée et va se fixer sur l'ADN simple brin non digéré (Figure 12C) (Shinohara, Ogawa, and Ogawa 1992). Une accumulation de RAD51 va alors former un filament nucléoprotéique envahissant et recrutant la région d'ADN homologue nécessaire à la formation d'un duplex d'ADN (Yoshida and Miki 2004). Les trois protéines, BRCA1, BRCA2 et RAD51, sont donc des intermédiaires moléculaires importants pour la réparation de l'ADN médiée par la HR.

Après la résolution de toutes ces étapes intermédiaires et le recrutement du brin homologue, il va y avoir formation d'un intermédiaire présentant deux hétéro-duplexes. Des ADN polymérases vont alors pouvoir répliquer le brin manquant avec pour matrice la séquence homologue (Figure 12D). Aux extrémités, deux jonctions de Holliday (HJ) seront reconnues puis clivées par des endonucléases, aboutissant ou non à un cross-over et finalement à une réparation des CDB.

1.3.3 Le remodelage de la chromatine

En association avec les mécanismes de réparation décrits ci-dessus, un processus favorise la mise en place de ces procédés biologiques : le remodelage de la chromatine. En effet, la double hélice d'ADN est entourée autour de nucléosomes, constitués des histones H2A, H2B, H3 et H4, permettant une compaction plus ou moins importante de l'ADN. Pour favoriser l'ensemble des mécanismes de réparation, plusieurs autres complexes

permettent de moduler la structure de la chromatine pour favoriser l'accessibilité des sites de dommages pour les protéines de réparation. Il est ainsi possible de distinguer plusieurs niveaux de régulation de l'ADN comme par exemple la régulation de la chromatine et l'ouverture de la double hélice d'ADN.

La structure de la chromatine influence fortement la réparation et la signalisation des CDB. En effet, le compactage de la chromatine influence la sensibilité des cellules aux CDB et l'efficacité de la DDR (Murga et al. 2007). Il a également été montré que la chromatine devenait plus « détendue » suite à l'induction de CDB (Ziv et al. 2006; Takahashi and Kaneko 1985), et cela de manière ATP-dépendante (Kruhlak et al. 2006). Il apparaît donc que l'efficacité de la DDR associée à des CDB est étroitement réglementée par la structure de la chromatine et que le processus lui-même peut moduler la chromatine. Différents complexes distincts vont pouvoir intervenir à chacun de ces niveaux de régulation de l'ADN en faveur de ces mécanismes de réparation.

Dans un premier temps, la modulation des nucléosomes représente la première étape dans la modification de la chromatine. Des membres des familles SWI/SNF (*Switch/Sucrose non-fermentable*), INO80 (*Putative DNA helicase INO80*) et ISWI sont responsables de modifications post-traductionnelles pouvant survenir sur les histones. Alors que les membres des familles SWI/SNF et INO80 acétylent les histones H3, H4 (Ogiwara et al. 2011; H.-S. Lee et al. 2010) et H2A/H2AX, H4 (Gorrini et al. 2007; Murr et al. 2006) respectivement, les membres de la famille ISWI sont responsables de la méthylation et de l'ubiquitination des histones (Nakamura et al. 2011). Une dernière famille, les CHD (*Chromodomain helicase DNA binding*), est également impliquée dans le remodelage de la chromatine mais sans modification des histones (Iles et al. 2007). Toutes les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine forment ainsi quatre grandes familles et présentent de forts liens avec les protéines à différents niveaux de la DDR. Un blocage des INO80 peut limiter le recrutement de BRCA1, TP53BP1 ou RAD51 au cours de la HR (Gospodinov, Tsaneva, and Anachkova 2009; Xu et al. 2010; Murr et al. 2006) tout comme le blocage des CHD ou de ISWI empêche le recrutement de BRCA1 ou de RAD51 et BRCA1 respectivement (Smeenk et al. 2010). De plus, les protéines

présentent de forts liens avec les protéines ATM, ATR et DNA-PK pour les SWI/SNF (Ogiwara et al. 2011; G. Peng et al. 2009) et Ku70, XRCC1 et DNA-PK pour les CHD (Gottschalk et al. 2009; Ahel et al. 2009). Le rôle de ces protéines est particulièrement important dans les mécanismes de réparation mais également dans la signalisation des dommages à l'ADN comme le suggère l'altération de la protéine WSTF, membre de la famille ISWI, affectant le maintien de la phosphorylation de H2AX sur sa Sérine 139 (Sánchez-Molina et al. 2011).

Ainsi, toutes ces familles de protéines permettent une modulation de la structure de la chromatine au cours de la DDR. Ces événements peuvent rapidement et transitoirement stabiliser la structure locale de la chromatine en créant une structure temporaire aux abords des CDB. Par la suite, la signalisation des CDB, avec notamment la phosphorylation de H2AX et l'activation d'ATM, conduit au recrutement ordonné de protéines de la réparation des CDB à la chromatine au niveau de ces cassures. Parmi ces protéines recrutées, on retrouve des protéines de modulation de la double hélice d'ADN : les hélicases.

Les hélicases sont particulièrement importantes avec notamment trois d'entre elles pouvant être impliquées dans des maladies. En effet, un défaut des hélicases WRN et BLM est responsable de l'apparition de maladies telles que le syndrome de Werner ou le syndrome de Bloom respectivement. Trois autres hélicases, RecQ1, RecQ4I et RecQ5 viennent s'ajouter à ces deux premières pour former la famille des hélicases RecQ appartenant à la superfamille II.

Les hélicases RecQ sont activement impliquées dans la réparation des CDB et certaines d'entre elles peuvent être recrutées à un stade précoce sur les sites de CDB (Singh et al. 2010; Zheng et al. 2009; Karmakar et al. 2006; Lan et al. 2005). Elles interagissent et modulent les fonctions de plusieurs protéines de réparation des CDB importantes à plusieurs étapes des voies de la NHEJ et de la HR. Les hélicases RecQ sont également impliquées – lors de processus plus tardifs de la réparation des CDB, notamment lors de la résection finale de l'ADN – dans la formation de la boucle de déplacement ou de la résolution des HJ (Bernstein, Gangloff, and Rothstein 2010). Les

protéines RecQ fonctionnent ainsi à plusieurs étapes, plus ou moins précoces, lors de la réparation des CDB (Ouyang, Woo, and Ellis 2008). Alors qu'il a été montré que RecQ1 et RecQ4l pouvaient interagir avec RAD51 (Sharma and Brosh 2007; Schwendener et al. 2010), RecQ5 peut interagir avec le complexe MRN (Zheng et al. 2009). Les hélicases WRN et BLM sont cependant mieux décrites dans la littérature. WRN joue un rôle important dans plusieurs étapes de la NHEJ. Son interaction avec les complexes Ku70/Ku80 et XRCC4/ADN Ligase 4 stimule son activité d'exonucléase (B. Li and Comai 2002; Cooper et al. 2000) alors que DNA-PK est nécessaire à son activité d'hélicase (Karmakar et al. 2002). BLM, quant à elle, est principalement impliquée dans la HR. Elle interagit avec l'EXO1, RAD51, mais également avec RPA et ATM (Pedrazzi et al. 2003; Sharma, Doherty, and Brosh 2006; Beamish et al. 2002; Braybrooke et al. 2003; L. Wu et al. 2001; Amitabh V Nimonkar et al. 2008).

Toutes ces hélicases participent ainsi au maintien de l'intégrité du génome. Elles jouent un rôle préférentiel dans les mécanismes de réparation des CDB comme la HR et la NHEJ et permettent l'ouverture de la double hélice d'ADN. Elles sont primordiales pour la modulation de la structure de la chromatine afin de favoriser la réparation de l'ADN. Elles peuvent également être impliquées dans d'autres processus comme dans la réponse à un stress réplcatif ou encore, comme pour RecQ4l, dans la réplication de l'ADN. En effet, aidée par la protéine MCM10, RecQ4l interagit avec les protéines de la fourche de la protéine CDC45, le complexe GINS ou avec une autre hélicase à ADN : le complexe MCM.

1.4 Les protéines MCM

Les protéines MCM (*Minichromosome maintenance*) ont, dans un premier temps, été identifiées chez la levure (Forsburg 2004). Ces dernières apparaissent comme des protéines jouant des rôles essentiels dans la réplication de l'ADN (Tye 1999a, 1999b). De plus, une séquence particulière appelée « boîte MCM » a été identifiée et caractérisée dans plusieurs protéines (Yan, Gibson, and Tye 1991) ce qui a mené à la constitution d'une famille de protéines : la famille MCM. Cette famille se compose d'au moins six homologues, MCM2 à MCM7 (Forsburg 2004), qui sont directement impliqués dans la

réplication de l'ADN (Bell and Dutta 2002). D'autres protéines ont par la suite été identifiées par homologie de séquence mais présentent des fonctions différentes comme la protéine MCM1 qui est un facteur de transcription, ou les protéines MCM8 et MCM9 (K. Y. Lee et al. 2015) qui sont impliquées dans les mécanismes de réparation des CDB.

1.4.1 Le complexe hexamérique MCM

Les protéines MCM2 à MCM7 sont exprimées chez tous les eucaryotes (Forsburg 2004). Chaque protéine MCM possède un domaine de 250 acides aminés qui encode pour une région à activité ATPasique (Koonin 1993), les incluant dans une superfamille d'enzyme, les AAA+. Ces enzymes présentent de multiples activités cellulaires telles que des activités d'hélicases de l'ARN ou de l'ADN, de protéases ou de chaperonnes (Iyer et al. 2004). Au sein de cette famille, il est possible de retrouver plusieurs facteurs de la réplication comme la protéine RFC (S. Chen et al. 2009), des protéines initiatrices ou des protéines du complexe de reconnaissance des origines de réplication (Erzberger, Mott, and Berger 2006).

Les protéines MCM, comme les autres protéines de la famille, s'oligomérisent en complexe sous la forme d'un anneau et vont utiliser la liaison à l'ATP puis son hydrolyse pour manipuler un substrat au sein de leur canal central. Dans le cas des protéines MCM, les sites ATPases vont être générés entre deux sous-unités adjacentes : l'une fournit les motifs Walker A et Walker B pour la liaison de l'ATP et l'autre partenaire fournit le motif Arginine pour l'hydrolyse de l'ATP. Le modèle de fonctionnement du complexe MCM prend exemple sur les hélicases homohexamériques virales de la superfamille 3 comme la protéine E1 du virus du papillome (Boos, Frigola, and Diffley 2012). Son blocage entraîne une inactivation rapide du réplisome (Labib, Tercero, and Diffley 2000; Pacek and Walter 2004).

L'organisation du complexe MCM a pu être déterminée suite à l'identification de dimères formant ces sites ATPases. Cinq paires de sous-unités ont été dénombrées : MCM5/MCM3, MCM3/MCM7, MCM7/MCM4, MCM4/MCM6 et MCM6/MCM2 (Davey, Indiani, and O'Donnell 2003; Bochman, Bell, and Schwacha 2008). En supposant que

chaque sous-unité n'entre en contact qu'avec deux autres sous-unités, l'identification de ces dimères a permis de suggérer l'agencement présenté dans la Figure 13. Ces protéines s'associent entre elles pour former un complexe hétérohexamérique dans un rapport 1:1:1:1:1:1. Le noyau du complexe MCM est composé des protéines MCM 4/6/7 ou MCM 2/4/6/7, protéines qui vont présenter une activité d'hélicase sur l'ADN (J. K. Lee and Hurwitz 2001; Z You, Komamura, and Ishimi 1999; Y Ishimi and Komamura-Kohno 2001). Les deux autres sous-unités, MCM3 et MCM5, seraient quant à elles impliquées dans la régulation de l'activité hélicase du complexe. De plus, les protéines MCM2, MCM3 et MCM5 pourraient avoir d'autres rôles pendant la réplication, comme MCM2 qui se lie aux histones pour faciliter la déposition des histones lors de la synthèse de l'ADN (Foltman et al. 2013).

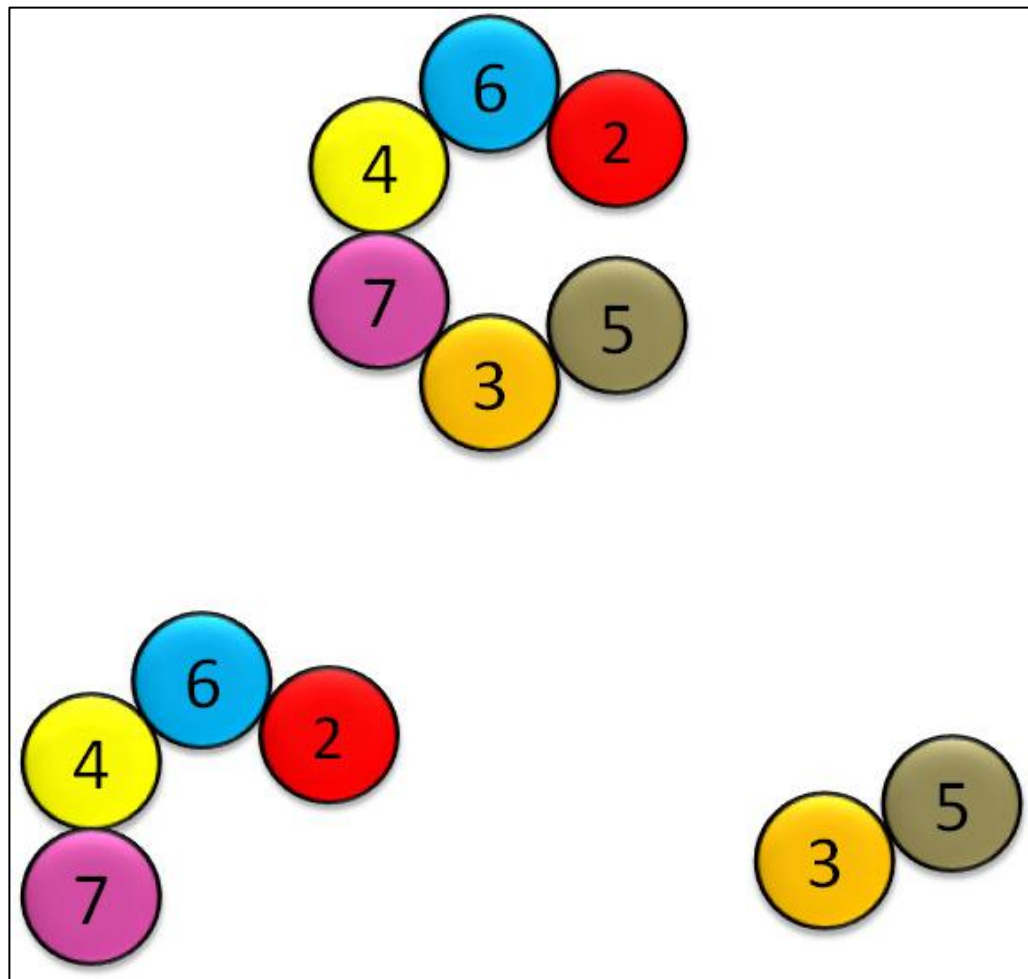


Figure 13. Schéma du complexe MCM. Organisation de l'hétérohexamère formé par le complexe MCM. Deux sous-complexes peuvent se distinguer : MCM 2/4/6/7 et MCM 3/5.

Cependant un dimère n'a pas pu être identifié : le dimère MCM 2/5. Cette interaction entre ces deux sous-unités prend néanmoins toute son importance lors de la formation et l'activation du complexe. Suite à son activation, le complexe MCM va alors changer de conformation, rapprochant les protéines MCM2 et MCM5 pour qu'elles interagissent et que le complexe MCM puisse présenter son activité hélicase. Les protéines MCM2 et MCM5 joueraient un rôle de porte d'activation du complexe (Matthew L. Bochman and Schwacha 2008). Il a également été suggéré que les sites ATPasiques actifs du complexe formaient deux groupes fonctionnels distincts : ceux fournis par MCM4, MCM6 et MCM7, nécessaires pour l'activité hélicase, et ceux apportés par MCM2, MCM3 et MCM5, régulant négativement l'activité de dénouement de l'ADN (Schwacha and Bell 2001). En effet, une activité hélicase de l'hétérotrimère MCM 4/6/7 a pu être détectée. Des systèmes ne possédant pas les sous-unités MCM2, MCM3 et MCM5, mais contenant deux copies de chacune des sous-unités MCM4, MCM6 et MCM7, présentent une activité de déroulement du double brin d'ADN (Z. You et al. 2002; J. K. Lee and Hurwitz 2000; Kaplan, Davey, and O'Donnell 2003). Cependant, l'addition de la protéine MCM2 ou du dimère MCM 3/5 inhibe l'activité hélicase du complexe MCM 4/6/7 (Sato et al. 2000).

1.4.2 Le rôle des MCM dans la réplication de l'ADN

Le recrutement du complexe MCM pour la formation du complexe de pré-réplication (complexe pré-RC) est extrêmement bien régulé et ne peut s'effectuer qu'à des moments précis du cycle cellulaire (Figure 14B) (J. Sun et al. 2013; T Tanaka, Knapp, and Nasmyth 1997; Aparicio, Weinstein, and Bell 1997). La destruction des régulateurs mitotiques par APC (*anaphase-promoting complex*) (Zachariae and Nasmyth 1999) et l'accumulation de facteurs d'initiation spécifiques de la phase G1 dont les protéines CDC6 (*Cell division control protein 6 homolog*) et CDT1 (*DNA replication factor Cdt1*) (Lygerou et al. 2000) vont favoriser le recrutement du complexe MCM. La protéine Geminin, notamment, va lier la protéine CDT1 pour prévenir spécifiquement le recrutement du complexe MCM aux origines de réplication jusqu'à l'anaphase (Figure 14A) (Tada et al.

2001). Par la suite, les protéines CDT1 et CDC6 vont fonctionner ensemble pour recruter le complexe MCM. La protéine MCM10 va alors venir interagir avec le complexe MCM pour le stabiliser et les protéines CDC7/DBF4 (*Cell division cycle 7-related protein kinase/Protein DBF4 homolog A*) vont venir le phosphoryler au moment de la transition entre les phases G1 et S (Im et al. 2009). La protéine CDT1 va alors se détacher du complexe de pré-RC et va laisser sa place à plusieurs facteurs de réplication tels que la protéine CDC45, l'ADN Pol- α , le complexe GINS ou encore la protéine RPA (Walter and Newport 2000). Toutes ces protéines vont alors former le complexe de réplication qui sera alors actif au cours de la phase S, permettant ainsi la réplication de l'ADN (Figure 14C).

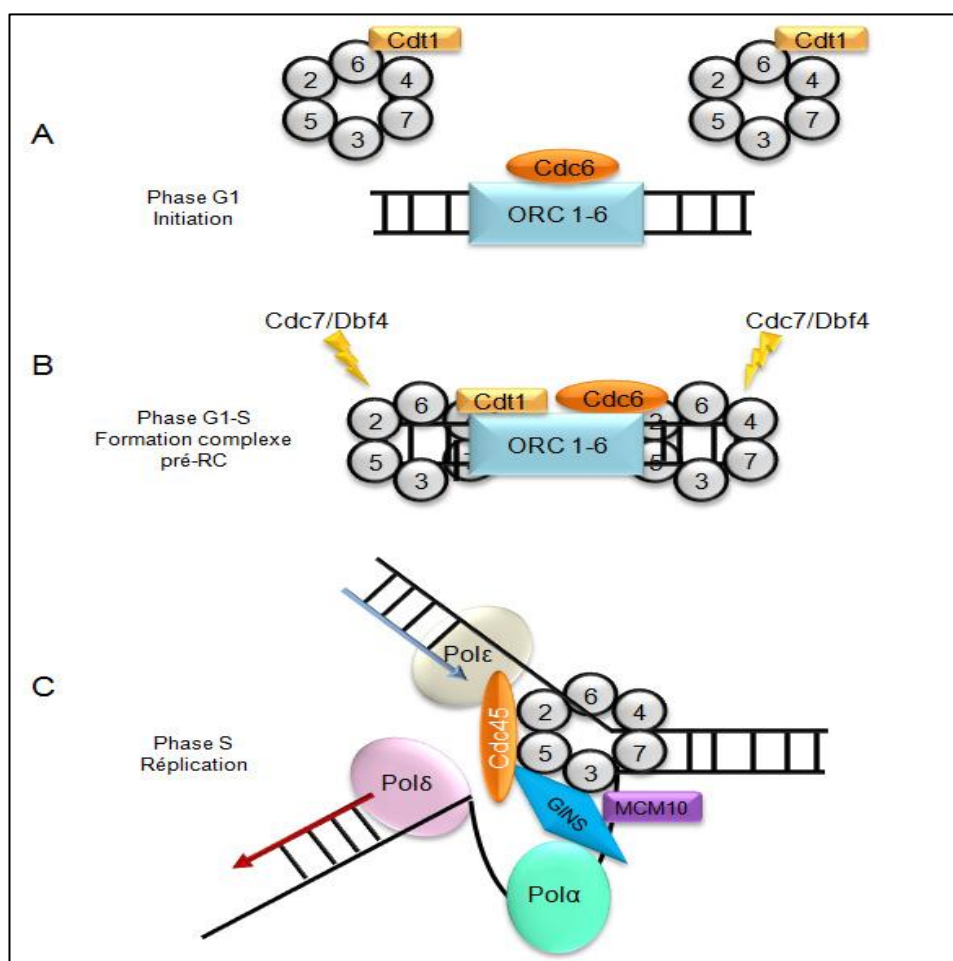


Figure 14. Schéma du recrutement du complexe MCM pour la réplication. (A) Au cours de la phase G1, le complexe de pré-réplication (pré-RC) va se former. Les protéines CDT1 et CDC6 vont permettre le recrutement du complexe MCM sur les origines de réplication. (B) Les protéines CDC7/DBF4 vont alors activer le complexe MCM au cours de la phase G1 tardive et de la phase S précoce permettant le détachement de CDT1. (C) Les protéines de la fourche de réplication telles que le complexe GINS, la protéine CDC45, la protéine MCM10 ou encore les ADN polymérases vont alors être recrutées pour former le complexe de réplication qui sera actif au cours de la phase S.

De manière intéressante, il a également été montré que les protéines MCM pouvaient être impliquées dans des rôles secondaires à la réplication. En effet, alors que le complexe MCM 4/6/7 peut former des HJ (Kaplan, Davey, and O'Donnell 2003), il a été montré que la protéine MCM2 pouvait jouer un rôle dans le remodelage des nucléosomes au cours de la réplication. MCM2 peut ainsi interagir avec la protéine ASF1A (*Anti-silencing function protein 1*), une chaperonne des histones H3 et H4, pour former un complexe permettant le réassemblage du nucléosome au cours de la réplication de l'ADN (Franco et al. 2005; Clément and Almouzni 2015; Natsume et al. 2007). Cela semble suggérer que les protéines MCM, outre leur implication dans la formation d'un complexe à activité hélicase de l'ADN, pourraient présenter des fonctions individuelles et possiblement indépendantes de cette fonction d'hélicase.

1.4.3 Le paradoxe des protéines MCM

Les protéines MCM présentent un paradoxe. En effet, les complexes MCM eucaryotes ne sont pas localisés sur les sites de réplication comme les hélicases virales et bactériennes mais sont répartis sur l'ADN non répliqué plutôt que sur les fourches de réplication. D'autre part, les hétérohexamères MCM en excès sont chargés sur la chromatine plutôt que sur les origines de réplication (Hyrien, Marheineke, and Goldar 2003). Dans de telles circonstances, il serait important de se demander comment le complexe MCM peut tenir son rôle d'hélicase au cours de la réplication.

De plus, la quantité de protéines MCM présentes à la chromatine varie selon les phases du cycle cellulaire. En effet, plus la phase S progresse, moins les protéines MCM sont présentes au foyer de réplication, pour finir avec un nombre très faible de protéines MCM qui seraient impliquées dans la réplication de l'ADN (Dimitrova et al. 1999). L'observation selon laquelle les protéines MCM sont présentes sur la chromatine non répliquée plutôt que sur la chromatine répliquée a souligné leur rôle dans le suivi de la chromatine non répliquée pour assurer un unique cycle de réplication de l'ADN (Krude et al. 1996). De plus, il est apparu que les protéines MCM étaient en nombre bien supérieur aux nombres d'origines de réplication (Ritzi et al. 1998; Lei, Kawasaki, and Tye 1996) :

alors qu'un ratio de 1:1 serait attendu, il s'avère que le nombre de protéines MCM est près de 40 fois supérieur à la quantité d'origines de réplication (Mahbubani et al. 1997), tout en sachant que seul un complexe MCM peut être recruté sur une origine de réplication. Pour finir, il a été constaté qu'une diminution de près de 90% des protéines MCM (Ibarra, Schwob, and Méndez 2008) n'impactait pas sur la croissance cellulaire, suggérant un excès des protéines MCM en condition normale.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour répondre à ce paradoxe. L'une d'entre elle serait une surveillance de la réplication par d'autres complexes MCM, activés en cas de problème de réplication. L'explication la plus plausible pour le « paradoxe MCM » serait que les cellules maintiendraient des complexes abondants répartis sur la chromatine en tant que « gardien » dans le cas d'une survenue d'un stress réplcatif naturel généré pendant la phase S. Cela permettrait à la cellule de continuer sa réplication quelles que soient les conditions. Cependant, le fait que la formation des complexes de pré-RC ne puisse se faire qu'une fois au cours du cycle cellulaire et uniquement aux origines de réplication, et que la protéine MCM2 et le sous-complexe MCM 4/6/7 présentent des fonctions secondaires, amèneraient à se demander si le complexe MCM pourrait avoir un autre rôle à jouer que sa fonction d'hélicase au cours de la réplication de l'ADN.

1.4.4 Le complexe MCM et les dommages à l'ADN

En plus de leur rôle dans la réplication de l'ADN, les protéines MCM sont également des cibles des points de contrôle lors des dommages à l'ADN ou suite à un stress réplcatif. En effet, alors que les protéines sont sujettes à de nombreuses phosphorylations, il a été suggéré que la phosphorylation de MCM2 par DBF4 pouvait influencer la réponse aux dommages à l'ADN et ralentir la fourche de réplication. Par ailleurs, la protéine MCM7 serait un partenaire direct de la protéine ATRIP, protéine nécessaire au recrutement d'ATR pour permettre la phosphorylation de CHK1 sur sa Sérine 345 (David Cortez, Glick, and Elledge 2004). ATR phosphorylerait également la protéine MCM4 permettant l'inhibition de l'ouverture de l'ADN et le ralentissement de la fourche de réplication. CHK1 peut également phosphoryler MCM3 sur sa Sérine 205 en condition normale, phosphorylation

diminuée lors de la présence de dommages à l'ADN (Xiangzi Han et al. 2015). Cette diminution de phosphorylation ne régulerait plus l'activité hélicase de manière négative, générant ainsi une ouverture de l'ADN plus longue ainsi que la présence de simple brin d'ADN qui permettront alors le recrutement de la protéine ATR. Par ailleurs, il a été montré que le complexe MCM, et en particulier la protéine MCM3, était nécessaire pour la phosphorylation de CHK1 sur sa Sérine 345 (Xiangzi Han et al. 2014). Pour finir, les protéines MCM2 et MCM3 sont des cibles des protéines ATM/ATR. En 2004, Cortez et collaborateurs ont pu identifier, en plus de l'interaction entre MCM7 et ATRIP, qu'en réponse à des RI, la protéine MCM3 était phosphorylée par ATM sur sa Sérine 535. Par la suite, ils ont pu montrer que la protéine MCM2 était phosphorylée sur sa Sérine 108 par la protéine ATR, aussi bien suite à un traitement par RI ou par blocage de la fourche de réplication par l'hydroxyurée (David Cortez, Glick, and Elledge 2004). Il a également été montré que MCM2 pouvait interagir directement avec ATM (H. Y. Yoo et al. 2004).

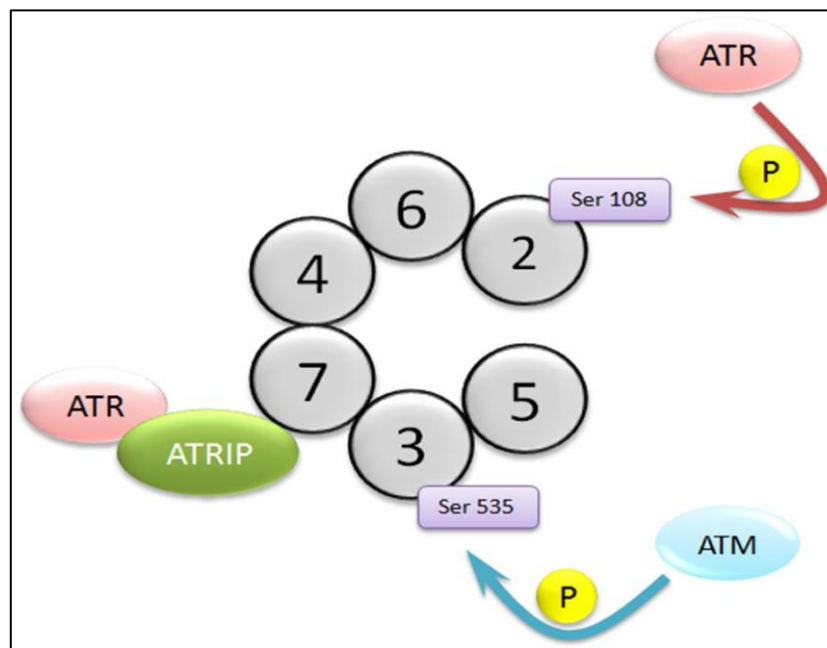


Figure 15. Schéma des interactions entre le complexe MCM et les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN. Il a été démontré qu'ATRIP pouvait interagir avec la sous-unité MCM7, qu'ATM phosphorylait MCM3 sur sa Sérine 535 en réponse à des RI, et qu'ATR phosphorylait MCM2 sur sa Sérine 108 en réponse à divers dommages à l'ADN.

1.5 Protéines possiblement impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN

Plusieurs protéines ont pu être identifiées par spectrométrie de masse au cours de mes expériences et plus particulièrement en réponse à des dommages double brin induits par l'étoposide. Ces protéines, Importine 7, Paladin et ASF1A sont alors décrites et introduites dans la section suivante.

1.5.1 Importine 7

La protéine Importine 7, qui sera identifiée par spectrométrie de masse par la suite, est une protéine d'import nucléaire. Alors que cette protéine a été décrite comme utilisée par le virus HIV pour faciliter son transport au noyau (Zaitseva et al. 2009), elle est surtout connue pour permettre l'import de la protéine Histone H1 (Bauerle, Doenecke, and Albig 2002; Jäkel et al. 1999). De plus, il apparaîtrait que la protéine Importine 7 jouerait un rôle dans l'import nucléaire des histone H3 et H4 (Soniati, Cağatay, and Chook 2016).

1.5.2 Paladin

La protéine Paladin a été identifiée comme étant une tyrosine phosphatase suite à l'analyse de sa séquence. De plus, il a été montré que cette protéine était impliquée dans la baisse de phosphorylation de la protéine Akt ce qui a pour conséquence une inhibition de la signalisation de l'insuline (Huang et al. 2009). Cependant, il a été suggéré que cette protéine serait une anti-phosphatase et son statut est encore sujet à débat (Roffers-Agarwal, Hutt, and Gammill 2012). Toutefois, et bien que son expression ait été détectée dans différentes lignées cellulaires, son autre fonction connue est son implication dans la formation de la crête neurale au cours de l'embryogénèse du poulet (Roffers-Agarwal, Hutt, and Gammill 2012).

1.5.3 ASF1A

ASF1A, pour *Anti-Silencing Function 1A* est une protéine impliquée dans la réplication de l'ADN. En effet, ASF1A est une chaperonne d'histones qui facilite leur importation au noyau et qui est impliquée dans le dépôt des histones au cours de la réplication. De plus, il a été montré qu'ASF1A a également un rôle à jouer au cours de la réparation de l'ADN (Canfield, Rains, and De Benedetti 2009) dans l'hétérochromatine par l'intermédiaire de HP1 (Yamane et al. 2011; Baldeyron et al. 2011) et qu'elle pouvait être régulée dans la réparation des CDB (Pilyugin et al. 2009). Elle peut également être associée à ATM dans la méthylation de l'histone H3 sur sa Lysine 56.

Cette introduction nous permet de conclure qu'un lien évident semble donc exister entre les protéines de la réplication et les protéines de la réparation de l'ADN.

2. Problématique et hypothèse

La recherche et le développement des connaissances sur les mécanismes de réparation des CDB semblent primordiaux. Cela permettrait de mieux comprendre la résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques et de développer de nouvelles approches afin de cibler plus spécifiquement les protéines de la DDR et d'améliorer les traitements existants. En 2010, Boisvert et collaborateurs ont cherché à étudier le changement de localisation de l'ensemble du protéome en réponse aux CDB générées par l'étoposide dans des cellules cancéreuses colorectales HCT116. Il est alors apparu que certaines protéines de la DDR présentaient un changement de localisation en faveur du noyau, telles que RPA, Ku70/80 ou la protéine DDB1 (*DNA damage binding protein 1*). Associées à ces protéines de la DDR, les protéines du complexe MCM sont également plus présentes au noyau en réponse aux CDB.

De par leurs caractéristiques présentées dans l'introduction, ainsi que leur paradoxe, leur lien avec les protéines-clés des mécanismes de réparation et de signalisation des dommages double brin de l'ADN telles qu'ATM, ATR ou CHK1 (Cortez, Glick, and Elledge 2004; Cortez et al. 2004; Han et al. 2014), nous amènent à penser que **le complexe MCM serait impliqué dans la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN.**

Deux objectifs principaux ont été fixés afin de répondre à cette hypothèse:

- 1) Caractériser les partenaires d'interaction du complexe MCM en réponse aux cassures double brin induites par l'étoposide.
- 2) Déterminer l'impact d'une diminution du complexe MCM sur la réponse cellulaire aux cassures double brin induites par l'étoposide.

3. Matériel et méthodes

3.1 Lignées cellulaires et culture cellulaire

3.1.1 Lignées cellulaires

3.1.1.1 U2OS FT

Des cellules U2OS (lignée cellulaire d'ostéosarcome humain) possédant le système Flp-InTM T-RExTM sont cultivées comme cellules adhérentes en milieu SILAC. La méthode de culture sera décrite dans la section 3.1.2.

Concernant le système Flp-InTM T-RExTM, cette technologie permet la génération de lignées cellulaires exprimant, stablement et sous induction, un gène d'intérêt par intégration médiée par la flippase (Flp) recombinase (Torres, Miller, and Jackson 2009b). Ceci implique en premier lieu, l'introduction d'un unique site cible pour la recombinaison Flp (Flp Recombination Target ou FRT) dans le génome de la lignée cellulaire d'intérêt, les cellules U2OS dans notre cas. Le plasmide pFRT/*lacZeo* est transfecté stablement dans la lignée cellulaire pour générer une lignée cellulaire Flp-InTM résistante à la ZéocineTM (cf. Figure 16).

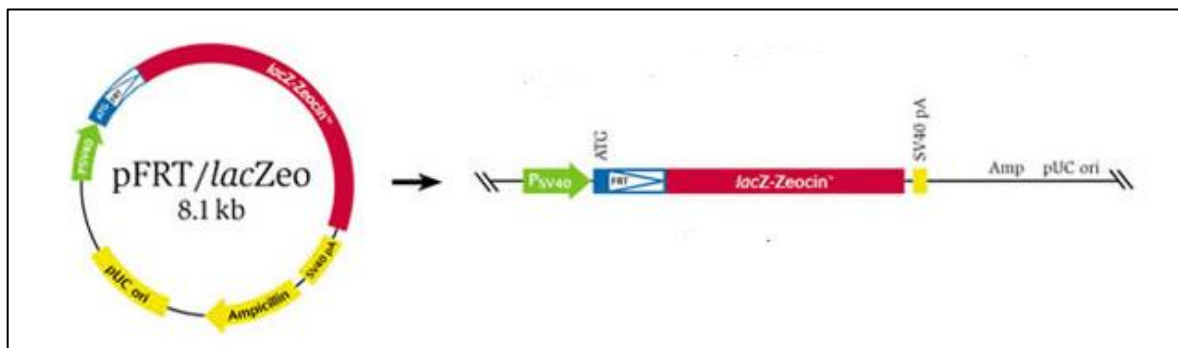


Figure 16. Schéma du plasmide pFRT/*LacZeo* nécessaire à la production de lignées cellulaires Flp-InTM résistantes à la Zéocine et possédant un site d'intégration FRT (image adaptée de Thermo Fisher Scientific).

3.1.1.2 HEK293

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293) sont des cellules embryonnaires de rein normales. Ces cellules ont également été cultivées comme cellules adhérentes et ont été utilisées pour les expériences d'étude des mécanismes de réparation HR et NHEJ qui seront décrites plus tard.

3.1.2 Culture cellulaire en milieu SILAC

Les différentes lignées cellulaires sont cultivées en milieu SILAC. Ce milieu est basé sur le milieu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) exempté des acides aminés Arginine et Lysine (#A14431-01, Invitrogen) et supplémenté avec du sérum bovin fœtal (FBS) dialysé 10% (#26400-044, Invitrogen), 100 U/ml de Pénicilline/Streptomycine (#15140-122, Invitrogen) et 2 mM de GlutaMax (#35050-061, Gibco). Les acides aminés Lysine et Arginine sont ensuite ajoutés à des concentrations finales de 28 et 49 µg/ml, respectivement, comme indiqué dans le Tableau 1.

Type de milieu	Marquage isotopique	Références du produit
Léger ou « Light » (L) R0K0	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	R0, #A5006 (Sigma-Aldrich)
		K0, #L5501 (Sigma-Aldrich)
Moyen ou « Medium » (M) R6K4	L-Arginine- $^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$	R6, #CLM-2265-H-PK (CIL, Inc.)
	L-Lysine- $^2\text{H}_4$	K4, #DLM-2640-PK (CIL, Inc.)
Lourd ou « Heavy » (H) R10K8	L-Arginine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$	R10, #CNLM-539-H-PK (CIL, Inc.)
	L-Lysine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$	K8, #CNLM-291-H-PK (CIL, Inc.)

Tableau 1. Liste des différents milieux SILAC utilisés avec les différents marquages isotopiques et les références des produits.

3.1.3 Induction des dommages à l'ADN

L'étoposide (#E1383, Sigma-Aldrich) est un médicament anti-tumoral agissant comme un inhibiteur de la topoisomérase II et provoquant des CDB au sein de l'ADN (Montecucco and Biamonti 2007). Des traitements à l'étoposide de concentrations et de

durées différentes sont appliqués sur les cellules (traitements détaillés dans la partie résultats). Un traitement au DMSO (diméthylsulfoxyde, C_2H_6OS) est utilisé pour réaliser les conditions non traitées de nos expériences.

3.2 Clonage et génération des lignées cellulaires stables

3.2.1 Lignées cellulaires stables U2OS pgLAP1 GFP-MCM2 et GFP-MCM5

3.2.1.1 Extraction de l'ARN messenger des cellules U2OS

L'ensemble des ARN messagers (ARNm) d'une culture de cellules U2OS a été extrait en suivant le protocole d'isolation au TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Le réactif TRIzol® est un réactif prêt à l'emploi pour l'isolement des ARN totaux à partir de cellules ou de tissus à utiliser pour l'analyse par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). C'est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet le maintien de l'intégrité des ARN pendant l'homogénéisation de l'échantillon (disruption des cellules et dissolution des composants cellulaires) (Chomzynski and Sacchi 1987). L'addition de chloroforme suivie d'une centrifugation va permettre de séparer la solution en phase aqueuse, contenant l'ARN, et en phase organique, contenant l'ADN et les protéines. L'ARN est récupéré par précipitation avec de l'isopropanol (ratio Isopropanol 100%:Trizol®, 1:2). L'ARN est ensuite lavé à l'éthanol 75% et resuspendu dans de l'eau exempte d'ARNases.

3.2.1.2 Génération d'une bibliothèque d'ADN complémentaires (ADNc) par RT-PCR

A partir de ces ARNm, une bibliothèque d'ADNc a été générée par RT-PCR. Pour l'obtention des ADNc, ceux-ci ont été obtenus en suivant le protocole de la ProtoScript® II Reverse Transcriptase (New England Biolabs). La polymérase qui a été utilisée pour l'obtention de tous les ADNc est la iProof™ High-Fidelity (Bio-Rad Laboratories).

3.2.1.3 Amplification des ADNc MCM2 et MCM5

Les ADNc des protéines MCM2 et MCM5 ont été amplifiés par PCR en utilisant les oligonucléotides de la bibliothèque d'ADNc précédemment générée. Les amorces PCR utilisées sont détaillées dans le Tableau 2. Les ADNc ont subi une dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, puis 30 cycles de dénaturation (10 secondes à 98°C) – hybridation (15 secondes à 68°C) – élongation (20 secondes par 1000 paires de bases à 72°C). Une élongation finale de 5 minutes à 72°C a également été réalisée. Pour permettre l'utilisation de la technique de clonage utilisant des séquences recombinantes (détaillée dans 3.2.1.4), des séquences *attB* ont été rajoutées en N- et C-terminal des ADNc de nos protéines d'intérêt MCM2 et MCM5 (cf. Figure 17).

3.2.1.4 Incorporation en vecteur pDONR 221

Les produits de PCR précédemment obtenus et flanqués de séquences *attB* ont ensuite été incorporés par recombinaison dans des vecteurs pDONR 221 (Life Technologies) possédant des sites *attP*. La réaction BP entre les sites *attB* des produits PCR et les sites *attP* du vecteur pDONR 221 est effectuée en utilisant le protocole de la BP Clonase II (Invitrogen) et se déroule comme indiqué dans la Figure 17.

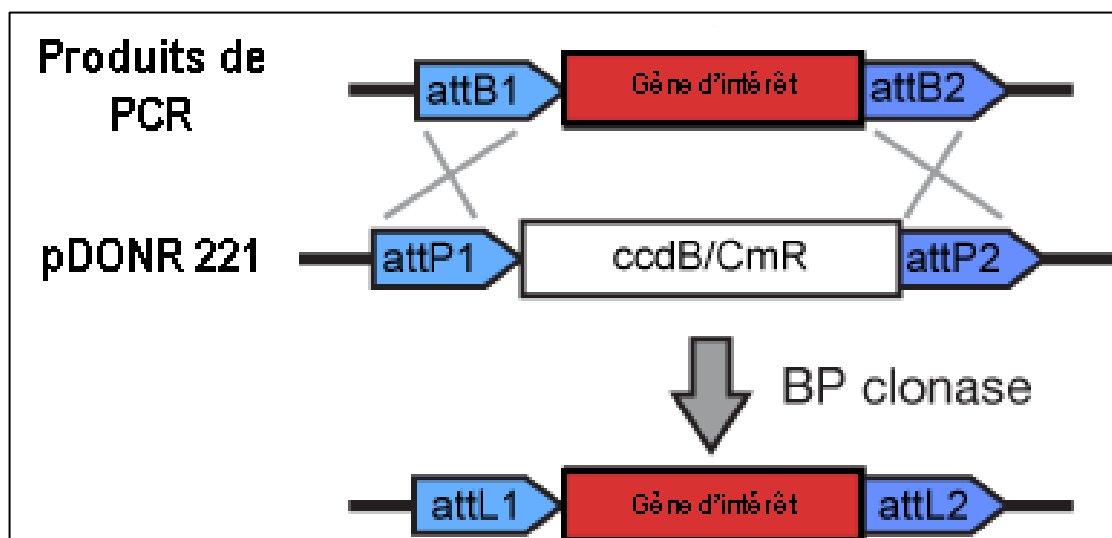


Figure 17. Schéma décrivant le principe de la réaction BP (*attB* x *attP*) permettant l'incorporation d'un gène d'intérêt dans un vecteur pDONR 221 (adapté du protocole de la BP clonase II).

3.2.1.5 Clonage par Gateway cloning

Le clonage par la technique du Gateway cloning (Invitrogen) (Torres, Miller, and Jackson 2009a) va permettre le transfert du gène d'intérêt du vecteur donneur pDONR 221 au vecteur d'expression pgLAP1. Ce transfert va s'effectuer par réaction LR. En effet, le vecteur d'expression pgLAP1 possède dans sa séquence des sites *attR* qui vont pouvoir, grâce à la LR clonase II, recombiner avec les sites *attL* du vecteur pDONR, permettant ainsi l'expression du gène d'intérêt dans le vecteur pgLAP1 (cf. Figure 18).

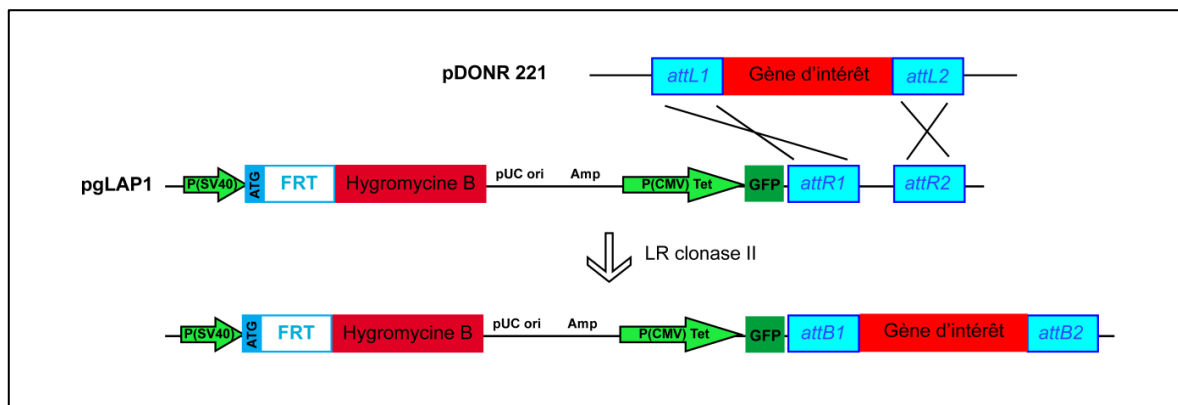


Figure 18. Schéma décrivant le principe de la réaction LR (*attL* x *attR*) permettant l'incorporation d'un gène d'intérêt dans un vecteur pgLAP1 (protocole de la LR clonase II).

Le vecteur d'expression pgLAP1 va également permettre l'ajout d'une étiquette GFP en N-terminal de la protéine, posséder un site FRT pour son inclusion dans des cellules possédant le système Flp-InTM T-RexTM et être sous le contrôle d'un promoteur Tet, inducible à la Doxycycline. Il contient aussi un gène de résistance à l'Hygromycine.

3.2.1.6 Transfection en cellules U2OS FT

Les lignées cellulaires U2OS FT stables sont générées suite à la transfection de ces dernières avec le plasmide pgLAP1, contenant l'ADNc d'intérêt, et le plasmide pOG44, exprimant la recombinaise Flp (ratio pgLAP1:pOG44 de 1:9). Cette transfection stable nécessite également deux réactifs, la lipofectamine[®] LTX et le PLUSTM (#15338100, ThermoFisher Scientific), ainsi que de l'Opti-MEM[®] (#31985062, ThermoFisher Scientific).

Deux mélanges de 300 µL sont réalisés avec d'un côté le mélange pOG44/pgLAP1, 5 µL de PLUS® et l'Opti-MEM®, et de l'autre, 8 µL de LTX et l'Opti-MEM. Ces deux mélanges sont incubés séparément 5 minutes à température ambiante puis ensemble, 10 minutes à température ambiante. La transfection des cellules U2OS FT, préalablement ensemencées dans des pétris de 60 mm et à environ 70-80% de confluence, se fait par incubation des cellules avec 3,4 mL de milieu frais et les 600 µL de mélange préalablement préparés, pendant 72 heures à 37°C. L'expression de la recombinaise va permettre l'insertion de l'ADNc d'intérêt au niveau du site unique FRT situé dans la lignée cellulaire U2OS possédant le système Flp-In™ T-REx™ (cf. Figure 16).

3.2.1.7 Sélection et induction

Une sélection à l'Hygromycine va permettre de sélectionner les cellules U2OS FT qui auront intégré le plasmide pgLAP1 au niveau de leur site FRT. Les cellules sont cultivées en présence de deux antibiotiques : l'Hygromycine B (#400-141-UG, Wisent) et la Blastidicine-HCl (#400-190-EM, Wisent) à des concentrations de 150 µg/ml et 15 µg/ml respectivement. L'induction du promoteur Tet s'effectue avec la Doxycycline (#450-185-XG, Wisent), une tétracycline semi-synthétique, à une concentration de 2 µg/ml. Cette induction va permettre l'expression des protéines GFP-MCM2 et GFP-MCM5 (cf. Figure 18).

3.2.2 Lignées cellulaires stables HEK293 pDRGFP et pimΔEJ5

Les plasmides pDRGFP, pimEJ5 et ISceI ont été fournis par le laboratoire du Pr Jean-Yves Masson (Université de Laval, Québec, QC). Ces plasmides ont été modifiés dans notre laboratoire pour remplacer le gène de résistance à la Puromycine par le gène de résistance à la Néomycine en utilisant la technique du Gibson assembly. Le gène GFP des vecteurs pGipz est remplacé par le gène mCHERRY en utilisant la même technique afin de ne pas interférer avec l'expression des protéines GFP issues de la réparation des plasmides pDRGFP et pimΔEJ5.

3.2.2.1 Modification de la résistance des plasmides

Le plasmide pDRGFP contient un gène de résistance à la Puromycine. Une PCR est effectuée pour enlever la séquence de ce gène. Une autre PCR va permettre d'amplifier la cassette Kanamycine/Néomycine du plasmide pEGFP. Une réaction de Gibson assembly va permettre d'intégrer le gène de résistance à la Néomycine dans le plasmide linéaire pDRGFP. Les amorces PCR utilisées sont détaillées dans le Tableau 2.

Le plasmide pimEJ5 a pu être modifié suite à plusieurs étapes, le but étant d'intégrer la cassette d'intérêt dans le plasmide pEGFP-C1. Il a, au préalable, fallu modifier les résistances des plasmides. Une PCR inverse a permis l'élimination des gènes de résistance à la Kanamycine et à la Néomycine de pEGFP-C1 et une PCR a permis l'amplification du gène de l'Ampicilline issu du plasmide puc19 (Figure 19A). Les amorces PCR utilisées sont détaillées dans le Tableau 2. Une réaction par Gibson assembly permet de remplacer la cassette Kanamycine/Néomycine par le gène de résistance de l'Ampicilline (Figure 19B). Ce nouveau plasmide pEGFP-C1 (Ampi) et le plasmide pimEJ5 ont été digérés par les enzymes de restriction Xho1 et Nhe1 (Figure 19B). Une ligation a permis d'insérer la cassette d'intérêt contenant les séquences GFP au sein du plasmide pEGFP-C1 (Ampi) que nous appellerons pimΔEJ5 (Figure 19C). Par la suite, une PCR inverse est effectuée sur pimΔEJ5 afin d'éliminer le gène codant pour la Puromycine présent dans la cassette d'intérêt. Une PCR sur le plasmide pEGFP-C1 initial permet d'amplifier les gènes de résistance à la Kanamycine et à la Néomycine (Figure 19C). Les amorces PCR utilisées sont détaillées dans le Tableau 2. Une réaction par Gibson assembly permet de remplacer la Puromycine par la cassette Kanamycine/Néomycine (Figure 19D) ce qui permet d'obtenir le plasmide pimΔEJ5 que nous allons utiliser par la suite.

3.2.2.2 Transfection en cellules HEK293

La transfection des plasmides pDRGFP et pimΔEJ5 se fait selon le protocole décrit dans la section 3.2.1.6 (à l'exception de l'ajout de pOG44).

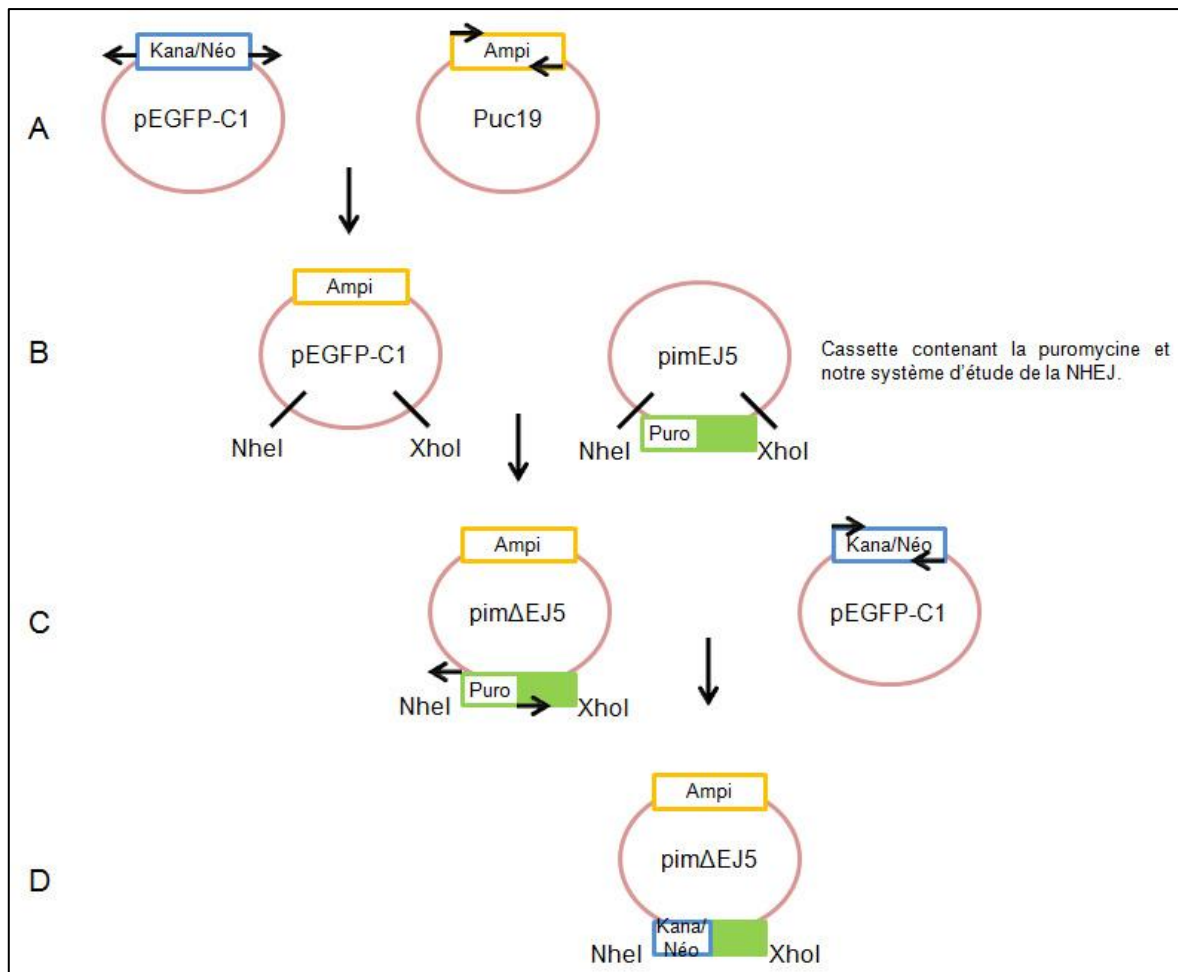


Figure 19. Schéma représentant les modifications effectuées sur le plasmide *pimEJ5*. (A) Elimination des gènes de résistance à la Kanamycine et à la Néomycine dans le plasmide *pEGFP-C1* et amplification du gène codant pour l'Ampicilline dans le plasmide *Puc19*. (B) Remplacement de la cassette Kanamycine/Néomycine par le gène de l'Ampicilline dans le plasmide *pEGFP-C1* par Gibson Assembly. Digestion de *pEGFP-C1* (*Ampi*) et *pimEJ5* par les enzymes de restriction *NheI* et *XhoI*. (C) Ligation et formation du plasmide *pimΔEJ5* résistant à la Puromycine. Amplification des gènes de résistance à la Kanamycine et à la Néomycine dans le plasmide *pEGFP-C1*. (D) Remplacement du gène de résistance à la Puromycine par la cassette Kanamycine/Néomycine par Gibson Assembly.

3.2.2.3 Sélection

Une sélection à la Puromycine va permettre de sélectionner les cellules HEK293 qui auront intégré le plasmide *pDRGFP* ou *pimΔEJ5* dans leur génome. Les cellules sont cultivées en présence de la Puromycine (#400-160-EM, Wisent) à une concentration de 600 µg/ml.

3.2.3 Amorces PCR utilisées pour les clonages

Amplification des ADNc MCM2 et MCM5		
MCM2	Forward	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCATGGCGGAATCATCGGAATCCTTC A-3'
	Reverse	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGAACTGCTGCAGGATCATTTC-3'
MCM5	Forward	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCATGGTCGGGATTCGACGATCCTGG CA-3'
	Reverse	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTGAGGCGGTAGAGAACCTTGC-3'
Modification de la résistance du plasmide pDRGFP		
Cassette Kana/Néo	Forward	5' GTTTAATAGATCATCAATTTCTCGATCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'
	Reverse	5' GCCTTTCGACCGATCCAGCCGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG-3'
pDRGFP	Forward	5' GGTGGCGGCTGGATCGGTGCGAAAG-3'
	Reverse	5' TCGAGAAATTGATGATCTATTAACAATAAAGATGTCCAC-3'
Modification de la résistance du plasmide pimeJ5		
pEGFP-C1	Forward	5' GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG-3'
	Reverse	5' ATTACACGCGCCCTGTAGCGGCGC-3'
Puc19	Forward	5' TCGCGCGCTACAGGGCGGTTAATGGTTTCTTAGACGTCAGG-3'
	Reverse	5' CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG-3'
pimΔEJ 5	Forward	5' CGCCCGCCCCACGACCCGCAG-3'
	Reverse	5' GGTGGCGGCTGGATCGGTGCGAAAGGC-3'
pEGFP-C1 Cassette Kana/Neo	Forward	5' GCCTTTCGACCGATCCAGCCGCCACCATGCTTGAACAAGATGGATTGCACGC-3'
	Reverse	5' CTGCGGGTCGTGGGGCGGGCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'

Tableau 2. Liste des différentes amorces utilisées lors des réactions PCR pour le clonage.

3.3 Production des shARN

Les lentivirus spécifiques utilisés sont les vecteurs pGipz (Dharmacon) ciblant MCM2 ou MCM3. Les shARN MCM2 (V3LHS_315340) et MCM3 (V3LHS_409660) sont exprimés en utilisant les séquences antisens AGTTGTTGTGATAGATGCC et TTCTTGACCTGCCATGACGT respectivement. Le vecteur lentiviral pGipz non codant sera utilisé comme contrôle.

3.3.1 Production des lentivirus

Les virus sont produits dans des cellules HEK293T. 30 µg d'un mélange de nos lentivirus et des plasmides PLP1, PLP2 et PLP-VSVG du kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen) sont incubés dans 750 µL d'OptiMEM pendant 5 minutes à température ambiante. Un deuxième mélange avec 60 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans 750 µL d'OptiMEM subit la même incubation. Les deux préparations sont ensuite mélangées et incubées 30 minutes à température ambiante. Le milieu de culture des HEK293T est remplacé par du milieu frais et le mélange de transfection est ajouté. Après une incubation de 3 heures à 37°C, 5% CO₂, les milieux de culture sont remplacés par du milieu frais pour une incubation de 2 jours à 37°C, 5% CO₂. Les virus seront alors récoltés puis filtrés à 0,45 µm.

3.3.2 Infection des cellules

4 µg/mL de polybrène sont ajoutés à 1,5 mL de virus préalablement produit et le mélange est déposé sur des cellules dont le milieu a été éliminé. Suite à une incubation de 1 heure à 37°C, 5% CO₂, 6,5 mL de milieu DMEM sont ajoutés. Après 2 jours, le milieu est changé et la sélection peut commencer en présence de 5 µg/ml de Puromycine.

3.4 Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur des lamelles en verre (préalablement désinfectées dans de l'éthanol 70%) dans des plaques six puits. A 60-70% de confluence, les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% (dilué dans le PBS 1X) pendant 15 minutes à température ambiante. Une fois fixées, les cellules sont rincées au PBS 1X puis perméabilisées avec du Triton X-100 0,5% (dilué dans le PBS 1X) pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage au PBS 1X, les cellules sont incubées sur une goutte d'anticorps primaire (dilué dans le PBS 1X) déposée sur paraffine pendant 1 heure à l'obscurité. Après cette incubation, les cellules sont lavées une fois avec du Triton X-100 0,1% (dilué dans le PBS 1X) et deux fois dans le PBS 1X. Les anticorps primaires sont

détectés avec des anticorps secondaires conjugués Alexa 488 ou 546 (Abcam) dilués dans le PBS 1X par incubation des lamelles pendant 1 heure à l'obscurité. Une coloration au 4.6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) va permettre de colorer l'ADN et de détecter les noyaux par la suite. Après un lavage au PBS 1X, les lamelles sont montées sur des lames de verre sur une goutte de liquide de montage ShandonTM Immu-MountTM (ThermoFisher Scientific). Les différents anticorps utilisés sont détaillés dans le Tableau 3 et les images de fluorescence sont obtenues avec un microscope droit à fluorescence Leica DM2500 Optigrid.

3.5 Fractionnement cellulaire

3.5.1 Étude des changements de localisation protéique

Les fractions nucléaire et cytoplasmique des cellules U2OS cultivées en milieu SILAC léger (R0K0) et lourd (R10K8) sont extraites. Pour cela, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X, resuspendues dans 5 mL de HEPES-KOH pH 7,9 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM et du dithiothréitol (DTT) 0,5 mM et incubées 5 minutes sur glace. Grâce à un homogénéiseur de Dounce, les cellules sont homogénéisées puis centrifugées 5 minutes à $200 \times g$ à 4°C. Le surnageant constitue la fraction cytoplasmique et le culot, la fraction nucléaire. Une cellule entière est reconstituée avec le cytoplasme issu des cellules cultivées en milieu léger et le noyau issu des cellules cultivées en milieu lourd.

3.5.2 Étude du phospho-protéome

Les fractions nucléaires des cellules U2OS cultivées en milieu SILAC sont extraites grâce à un kit de fractionnement (Cell fractionation kit, Cell signaling #9038). Les cellules sont rincées au PBS 1X puis trypsinisées. Du milieu froid est ajouté et les cellules sont centrifugées 5 minutes à $350 \times g$. Le culot cellulaire est resuspendu et lavé dans 500 µL de PBS 1X puis centrifugé pendant 5 minutes à $500 \times g$ à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 300 µL de tampon CIB, incubé sur glace pendant 5 minutes et centrifugé pendant 5 minutes à $500 \times g$ à 4°C. Le surnageant constitue la fraction cytoplasmique. Le

culot cellulaire est resuspendu dans 300 μ L de tampon MIB, incubé 5 minutes sur glace et centrifugé pendant 5 minutes à 8000 $\times g$ à 4°C. Le surnageant représente la fraction membranaire et les organelles. Le culot est ensuite incubé dans 300 μ L d'HEPES pH 8,0 10 mM, urée 8M et représente la fraction nucléaire.

3.6 Immunoprécipitation

Les cellules sont récoltées et lysées pendant 30 minutes sur glace dans du tampon d'immunoprécipitation (IP). Deux types de tampon d'IP sont utilisés : (1) Tampon Triton (Triton X-100 1%, Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM et l'inhibiteur de protéases *Roche Complete Protease Inhibitor*) ou (2) Tampon RIPA (Tris pH 7,4 50 mM, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 5%, NaF 50 mM, PMSF 1 mM et l'inhibiteur de protéases *Complete EDTA protease inhibitor*). Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13000 $\times g$ à 4°C et des quantités égales de protéines sont incubées avec des billes d'agarose GFP-Trap® de ChromaTek (Martinsried, Germany) pendant 2 heures à 4°C pour permettre aux protéines étiquetées GFP d'être retenues par les billes. Ces dernières sont ensuite rincées trois fois avec le tampon d'IP précédemment utilisé et deux fois dans le PBS 1X. Après élimination du PBS 1X, les billes sont resuspendues dans le tampon Laemmli et incubées 5 minutes à 98°C afin d'éluer les protéines retenues par les billes.

3.7 Digestion protéique

3.7.1 Étude du phospho-protéome

3.7.1.1 Digestion liquide

La digestion liquide est réalisée après obtention de la fraction nucléaire (décrite dans la section 3.5.1). Le culot nucléaire resuspendu dans 300 μ L d'HEPES pH 8,0 10 mM, urée 8M est soumis à une sonication (12x5 secondes à une intensité de 25%). 1,5 μ g de DTT sont ajoutés à 250 μ L de l'échantillon, incubé 2 minutes à 98°C puis 30 minutes à température ambiante. 7,5 μ g d'iodoacétamide (IAA) sont ajoutés pendant 20 minutes à

température ambiante à l'obscurité. La concentration d'urée est diminuée à 2 M en ajoutant une solution de sodium bicarbonate (NH_4HCO_3) 50 mM. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de trypsine est ensuite ajouté sur la nuit à 30°C. Les échantillons sont enfin acidifiés à une concentration finale de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Les peptides sont purifiés avec une colonne HYPERSEP C18, 100 mg/1 mL (Thermo Scientific, #60108-32) précédemment rincée avec de l'acétonitrile 100% puis du TFA 0,1%. Après passage des échantillons dans la colonne et trois lavages au TFA 0,1%, les peptides sont élués grâce à un tampon d'élution composé de 50% d'acétonitrile et 2% d'acide formique (FA), lyophilisés au speedvac et resuspendus dans 100 μL de FA 2% pour le dosage. L'acétonitrile et le FA sont ajoutés jusqu'à un volume final de 500 μL à des concentrations finales de 80% et 2% respectivement.

3.7.1.2 Enrichissement des phosphopeptides

Le kit *Pierce magnetic titanium dioxide phosphopeptide enrichment* est utilisé pour purifier les phosphopeptides. 50 μL de billes de TiO_2 20X (1 μL de billes pour 10 μg de protéines) sont mélangées à 950 μL de solution de liaison. Les billes sont séparées avec un séparateur magnétique et le surnageant est jeté (cette étape est répétée trois fois). Les 500 μL d'échantillon préparés précédemment (cf. 3.7.1.1) sont incubés avec les billes pendant 10 minutes à 1250 rpm. Les billes sont ensuite séparées avec un séparateur magnétique et rincées quatre fois avec du tampon de liaison et une fois avec le tampon de lavage. Les billes sont ensuite incubées avec 150 μL de solution d'élution pendant 10 minutes à 1250 rpm. Le surnageant contenant les phosphopeptides est collecté et lyophilisé sur speedvac. Les phosphopeptides sont resuspendus dans 25 μL de FA 1%.

3.7.2 Digestion sur gel

Les protéines sont séparées sur gel SDS PAGE 1D (4-12% Bis-Tris Novex mini-gel, Life Technologies) et visualisées par coloration au bleu de Coomassie (Simply Blue Safe Stain, Life Technologies). Après décoloration, la bande de gel est excisée et coupée en huit fractions et chacune de ces fractions est soumise à une digestion tryptique sur gel (Shevchenko et al. 1996). Les peptides tryptiques résultant de cette digestion sont extraits

avec du FA 1%, puis de l'acétonitrile 100%, lyophilisés sur speedvac et resuspendus dans l'acide formique 1%. Les protéines sont réduites dans 10 mM de DTT, alkylées dans 50 mM d'IAA et incubées 5 minutes à 98°C dans du tampon de chargement.

3.8 Tests de croissance cellulaire

Après ensemencement du même nombre de cellules pour chaque condition, les cellules sont rincées dans du PBS 1X puis récoltées par trypsinisation après différents temps de culture (temps détaillés dans les résultats). Du milieu frais est ajouté et les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le culot cellulaire est lavé au PBS 1X et les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X et comptées pour établir les courbes de croissance cellulaire.

3.9 FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Les cellules sont ensemencées et récoltées comme dans le protocole de test de croissance cellulaire. Pour l'étude de la répartition du cycle cellulaire, après lavage du culot cellulaire au PBS 1X, les cellules sont resuspendues dans de l'éthanol 70% froid contenant de l'iodure de propidium (IP*) et de l'ARNase A pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X et resuspendues dans ce dernier pour être analysées par FACS grâce au cytomètre BD Fortessa (Berton Dickinson). Pour l'étude des mécanismes de réparation sur les cellules HEK293 transfectées avec les plasmides pDRGFP et pimΔEJ5, la préparation est la même sans l'incubation des cellules dans le mélange éthanol 70%, IP* et ARNase A. 100 000 cellules ont été comptées par FACS et les cellules ont été analysées selon leurs tailles (FSC) en fonction de leurs intensités de GFP. Un décalage vers la droite représente les cellules ayant une intensité de GFP plus importante que la majorité des cellules, considérées comme GFP négatives. Une zone à l'extérieur des cellules GFP négative a été tracée permettant le décompte de toutes les cellules comprises dans cette zone, considérées comme GFP positives.

3.10 Tests de survie ou « Tests MTT »

Le même nombre de cellules est cultivé pour chaque condition sur des lamelles de verre dans des plaques 6 puits. Après 24 heures, le « test MTT » est réalisé et consiste en l'ajout de 100 µL de tampon MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) dans chaque puits et une incubation de 2 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X puis 200 µL d'isopropanol contenant de l'HCl 1% sont ajoutés. Après mélange de la préparation, 100 µL sont transférés dans une plaque 96 puits et la DO (densité optique) à 550 nm est notée.

3.11 Immunobuvardage

Pour la détection des protéines par immunobuvardage, les cellules sont rincées trois fois dans le PBS 1X, lysées directement dans le tampon Laemmli et incubées 5 minutes à 98°C. Le même volume est ensuite séparé sur SDS-PAGE 1D puis transféré sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Life Science). La membrane est ensuite bloquée dans une solution de lait 5%/tampon de lavage 1X. Les membranes sont rincées 3 fois dans du tampon de lavage 1X puis incubées avec les anticorps primaires dilués dans un tampon composé de BSA 1%, ovalbumine 0,5%, Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM et NaN₃ 0,01%. Elles sont ensuite rincées 3 fois dans le tampon de lavage 1X et incubées avec les anticorps secondaires dilués dans le tampon suivant : BSA 2%, Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM et lait 1%. Les membranes sont ensuite révélées avec le substrat Clarity Western ECL (BioRad, cat#170-5061) dans le système Chemidoc MP imaging (BioRad). Les différents anticorps utilisés sont détaillés dans le Tableau 3.

3.12 Analyse LC/MS-MS et quantification

3.12.1 Analyse LC/MS-MS

Les peptides tryptiques digérés sont séparés grâce au système Dionex Ultimate 3000 nanoHPLC. 10 µL de l'échantillon (un total de 2 µg) dilué dans le FA 1% (v:v) sont chargés avec un flux constant de 4 µL/minute dans une colonne Acclaim PepMap100 C18 (0,3 mm id x 5 mm, Dionex Corporation). Après enrichissement, les peptides sont élués de la colonne PepMap C18 nano (75 µm x 50 cm, Dionex Corporation) avec un gradient linéaire de solvant B (acétonitrile 90% et acide formique 0,1%) de 5 à 35%, dilué dans du solvant A (eau pour spectrométrie de masse) pendant 240 minutes à un flux constant de 200 nL/min. Le système HPLC est couplé à un spectromètre de masse OrbiTrap QExactive (Thermo Fisher Scientific) via une source EasySpray. La tension de vaporisateur a été réglée à 2.0 kV et la température de la colonne a été réglée à 40°C. Un scan général donnant une vue d'ensemble du spectre (m/z 350/1600) est acquis avec l'OrbiTrap avec une résolution de 70,000 et après une accumulation de 1,000,000 d'ions. Les 10 peptides les plus intenses du scan général sont fragmentés par collision induisant leur dissociation (énergie normale de collision : 35% ; résolution : 17,500) après une accumulation de 50,000 ions. Les temps de remplissage maximaux sont de 250 ms pour le scan général et de 60 ms pour les scans MS/MS. L'état de charge de l'ion précurseur a été activé et tous les états de charge non affectés ainsi que les espèces chargées 1, 7 et 8, ont été rejetées. La liste d'exclusion dynamique a été restreinte à un maximum de 500 entrées avec une période maximale de rétention de 40 secondes et une fenêtre de masse relative de 10 ppm. L'option de verrouillage des masses a été permise par le scan général pour améliorer l'exactitude massive. Les données sont acquises en utilisant le logiciel Xcalibur. Les modifications variables de phosphorylation ont été ajoutées pour identifier et quantifier les phosphopeptides.

3.12.2 Quantification et analyse bioinformatique

Les données sont traitées, recherchées et quantifiées en utilisant le logiciel MaxQuant 1.4.1.2 et la base de données Human Uniprot (16/07/2013, 88,354 entrées). Les paramètres utilisés pour l'analyse MaxQuant sont les suivants : mis-clivages permis = 2 ; modification fixée = carbamidométhylation sur Cystéines ; enzyme = trypsine (coupure après les Lysines et les Arginines sauf si l'acide aminé précédent est une Proline) ; modifications variables : oxydation des Méthionines et acétylation N-terminale. Une tolérance massive de 7 ppm et de 20 ppm sont admises pour les ions précurseurs et les ions fragmentés respectivement. L'option de re-quantification est sélectionnée pour calculer le ratio des différents isotopes non assemblés dans des paires de SILAC. Pour réaliser des identifications fiables, l'acceptation des protéines est basée sur les critères que le nombre de protéines identifiées dans la base de données était au moins 100 fois plus élevé que le nombre de protéines identifiées dans une base de données dans laquelle les séquences ont été inversées, aboutissant ainsi à un taux de découverte faux (FDR ou *False discovery rate*) de moins de 1 %. Un minimum de 2 peptides est quantifié pour chaque protéine. Les protéines et leurs isoformes qui ne peuvent pas être distingués selon les peptides identifiés sont groupés et affichés sur une ligne avec les différents numéros d'accession. Les données de spectrométrie de masse ont été déposées au consortium de ProteomeXchange via le dépôt partenaire PRIDE avec l'identifiant d'ensemble de données PXD001949 (uniquement pour la protéomique spatiale). Les logiciels KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et DAVID 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov>) (D. W. Huang, Sherman, and Lempicki 2009, 2008) ont été utilisés pour classer les protéines identifiées lors des analyses de spectrométrie de masse en fonction de leur rôle principal au sein de la cellule.

3.13 Anticorps utilisés

Anticorps primaires				
Cible	Hôte	Clonalité	Fournisseur	Référence
ASF1	Lapin	Monoclonal	Cell Signaling	#C6E10
γ H2AX [Ser139]	Lapin	Polyclonal	Santa Cruz	#sc-101696
GAPDH	Lapin	Polyclonal	Cell Signaling	#5174
GFP	Souris	Monoclonal	Roche	#11814460001
H2B	Lapin	Polyclonal	Cell Signaling	#2722
MCM2	Lapin	Polyclonal	Abcam	#Ab31159
MCM3	Lapin	Polyclonal	Santa Cruz	#sc-365616
MCM5	Lapin	Polyclonal	Abcam	#Ab75975
MCM7	Souris	Monoclonal	Abcam	#Ab2360
Phospho-CHK1 [S345]	Lapin	Monoclonal	Cell Signaling	#2348
Phospho-CHK2 [T68]	Lapin	Monoclonal	Cell Signaling	#2197
Phospho-P53 [S15]	Souris	Monoclonal	Cell Signaling	#9286
Anticorps secondaires				
Cible	Hôte	Conjugué	Fournisseur	Reference
<i>Immunobuvardage</i>				
IgG de lapin	Chèvre	HRP	Cell Signaling	#7074S
IgG de souris	Chèvre	HRP	Cell Signaling	#7076S
<i>Immunofluorescence</i>				
IgG de lapin	Chèvre	Alexa Fluor® 488	InVitrogen	#1024116
IgG de lapin	Chèvre	Alexa Fluor® 546	InVitrogen	#949214
IgG de souris	Chèvre	Alexa Fluor® 488	InVitrogen	#1008801

Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage et d'immunofluorescence.

4. Résultats

4.1 La protéomique quantitative révèle des changements d'interaction du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide

Toutes les données de cette partie sont issues et adaptées de l'article « Quantitative Proteomics Reveals Dynamic Interactions of the Minichromosome Maintenance Complex (MCM) in the Cellular Response to Etoposide Induced DNA Damage. » dont les auteurs sont Romain Drissi, Marie-Line Dubois, Mélanie Douziech et François-Michel Boisvert. Cet article a été publié en juillet 2015 dans le journal Molecular & Cellular Proteomics (MCP) (cf. Annexe 1).

4.1.1 Le complexe MCM change de localisation en réponse aux cassures double brin (CDB) induites par l'étoposide

Afin de mieux identifier les protéines pouvant être mises en jeu lors de la survenue de CDB, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative pour mesurer la composition des différentes fractions cellulaires : c'est la « protéomique spatiale » (Boisvert et al. 2010). Cette technique permet de mesurer la distribution de milliers de protéines dans une cellule en combinant le fractionnement cellulaire et la spectrométrie de masse. Cette méthode implique, en premier lieu, la culture des cellules dans différents milieux SILAC afin d'effectuer un marquage complet de toutes les protéines. L'approche SILAC consiste à remplacer les Arginines et les Lysines des milieux de culture par des acides aminés équivalents mais qui vont présenter un marquage isotopique spécifique (Ong et al. 2002). Le Tableau 1 (cf. 3.1.2) référence les différents milieux SILAC utilisés ainsi que les différents marquages isotopiques. Ces acides aminés alourdis seront alors incorporés dans les protéines, modifiant ainsi leur masse (mais pas leur charge) (Ong, Foster, and Mann 2003). Ces protéines alourdies pourront être discriminées par spectrométrie de masse selon leur provenance. Les cellules ainsi cultivées et marquées en

milieu SILAC sont alors fractionnées en différentes fractions. On obtient par exemple la fraction cytoplasmique ou encore la fraction nucléaire. Ces dernières seront par la suite recombinaées de telle façon que chaque fraction possédera une signature isotopique distincte (Figure 20A). Ce marquage isotopique, permis par la culture en milieu SILAC, permet une quantification relative de l'abondance des peptides issus des différentes fractions subcellulaires. Cette technique a déjà été utilisée pour étudier la distribution relative du protéome entre le cytoplasme, le noyau et le nucléole (Boisvert et al. 2010).

Par cette approche, nous allons donc pouvoir identifier les protéines qui vont présenter un changement de localisation dans leur distribution cellulaire en réponse à un traitement à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, connu pour engendrer des CDB dans l'ADN (Figure 20B). La protéomique spatiale va donc nous permettre d'identifier les protéines éventuellement impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.

Parmi les 1933 protéines identifiées, 93 d'entre elles vont montrer un changement de localisation de la fraction cytoplasmique à la fraction nucléaire. Parmi ces protéines, nous avons cherché à identifier les protéines ayant des fonctions cellulaires connues et étant particulièrement affectées en réponse aux CDB de l'ADN. Pour cela, elles ont été analysées grâce à la ressource bio-informatique KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Figure 20C).

Nous avons ainsi pu déterminer quatre voies de signalisation significativement enrichies ($p\text{-value} < 0,01$) et incluant 23 des 93 protéines initialement identifiées (Figures 20D-E). Les mécanismes de la réplication de l'ADN, de la dégradation de l'ARN, de la NER et de la NHEJ sont impactés. De façon intéressante, parmi les protéines qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN, les six protéines nécessaires à la formation du complexe MCM ont été identifiées (Figure 20E).

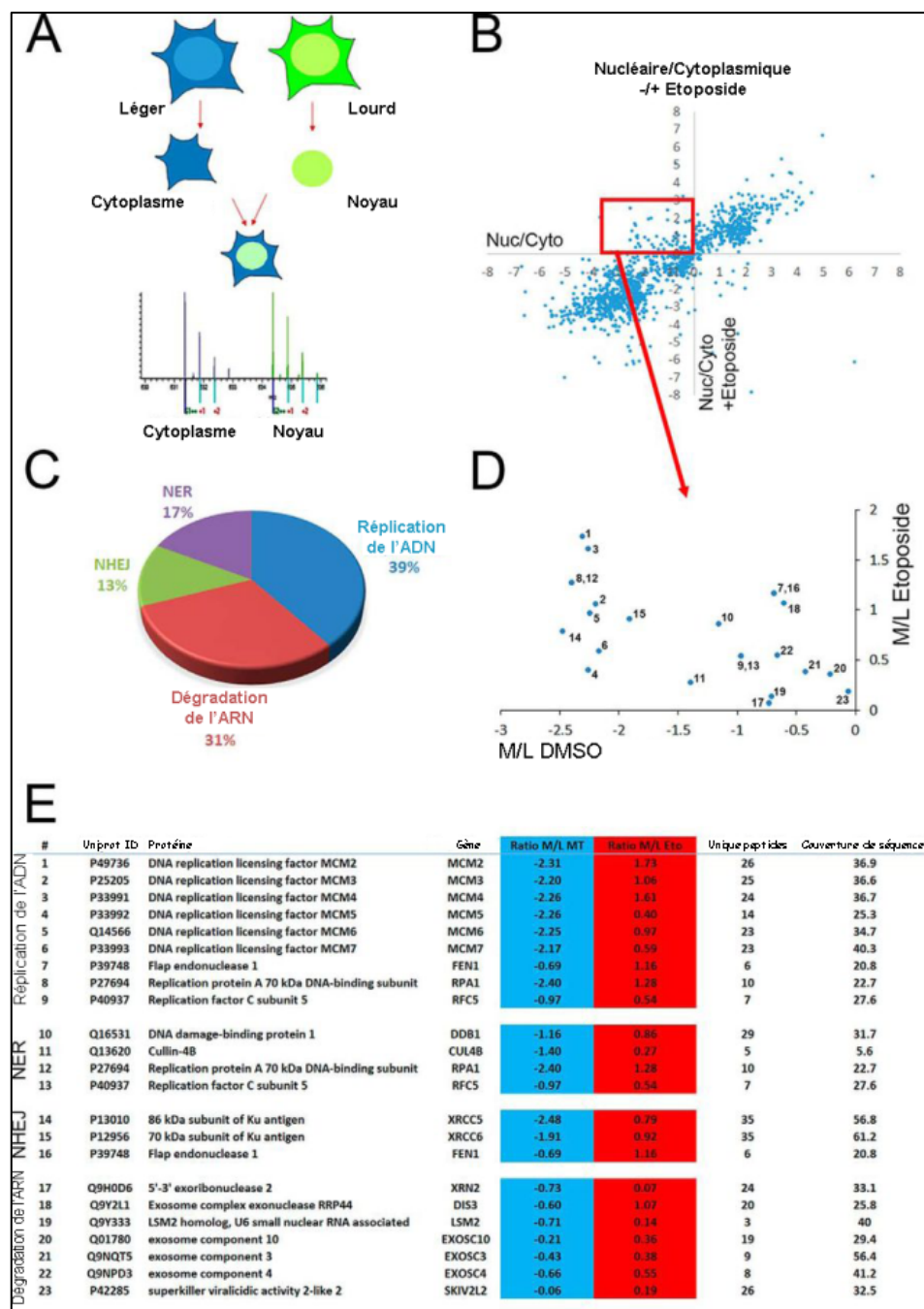


Figure 20. Relocalisation subcellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. (A) Diagramme schématisant la méthode de protéomique spatiale utilisée pour quantifier les protéines cytoplasmiques et nucléaires. Les protéines issues des cellules marquées par culture en milieu SILAC sont fractionnées biochimiquement en fractions cytoplasmique et nucléaire. Ces fractions sont, par la suite, recombinaisonnées avant d'être identifiées et quantifiées par spectrométrie de masse. (B) Ratios Noyau/Cytoplasme des cellules ayant subi une simulation de traitement au DMSO (axe x) comparativement aux protéines traitées avec 50 µM d'étoposide pendant 1 heure (axe y). (C) L'analyse des voies de signalisation KEEG (KEEG Pathway) des 93 protéines montre une relocalisation de la fraction cytoplasmique à la fraction nucléaire en réponse aux dommages à l'ADN. (D) Numérotation des 23 protéines identifiées dans les voies de signalisation KEEG en fonction de la table (E) qui montre la liste des protéines identifiées dans chacune des voies KEEG. (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) disponible en Annexe 1)

4.1.2 Identification des partenaires d'interaction des protéines MCM2 et MCM5.

Dans le but de caractériser la possible implication des protéines MCM dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, nous avons décidé d'identifier les protéines interagissant avec différentes protéines MCM en absence ou en présence de dommages à l'ADN induits par un traitement à l'étoposide. Premièrement, nous avons généré des lignées cellulaires U2OS stables et inductibles à la Doxycycline qui expriment les protéines MCM2 et MCM5 à un niveau proche du niveau endogène. Ces lignées cellulaires ont été générées en transfectant des cellules U2OS possédant le système Flp-In (U2OS FT) avec des plasmides pGLAP1 GFP-MCM2 ou GFP-MCM5. Les cellules U2OS FT qui ne possèdent qu'un seul site d'intégration vont alors, par recombinaison, exprimer les protéines MCM2 ou MCM5 étiquetées GFP en N-terminal (Figure 21). Les protéines GFP-MCM2 et GFP-MCM5 ont été retrouvées exprimées à des niveaux similaires de ceux constatés pour les protéines endogènes (Figures 21A-B, ligne 4). En réalité, l'expression exogène de ces protéines semble entraîner une réduction de l'expression des protéines endogènes. Cela suggérerait un possible mécanisme de régulation de la quantité totale de protéines MCM présentes dans la cellule (Figures 21A-B, comparaison des lignes 3 et 4). Les protéines MCM étiquetées GFP ont été principalement retrouvées au noyau comme le démontre notre expérience d'immunofluorescence par microscopie en utilisant un anticorps anti-GFP (Figures 21D-F).

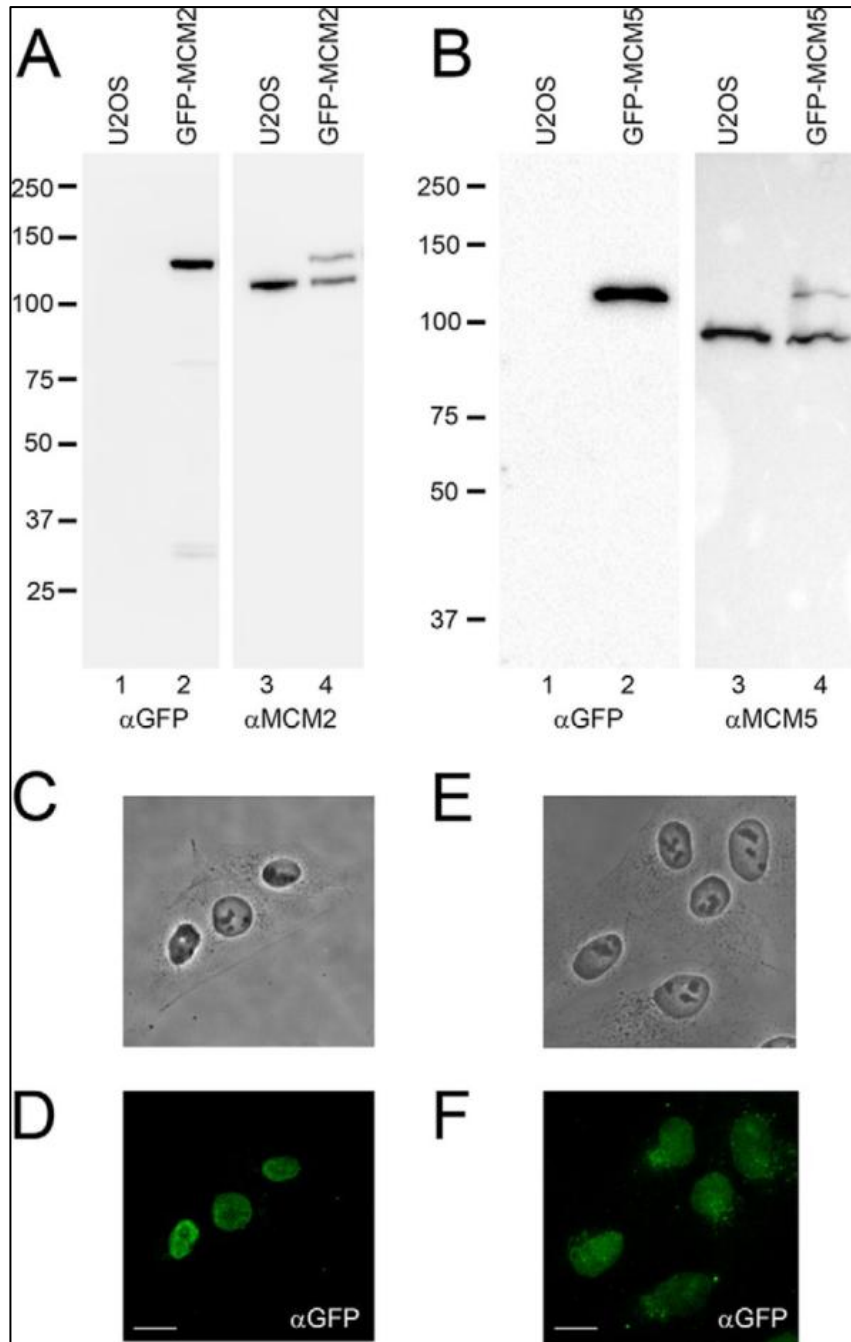


Figure 21. Génération de lignées cellulaires stables exprimant les protéines GFP-MCM2 ou GFP-MCM5. Les protéines GFP-MCM2 et GFP-MCM5 ont été générées par recombinaison dans le site d'intégration spécifique des cellules U2OS FT. Les extraits cellulaires sont issus des cellules U2OS FT non induites (**A-B, lignes 1 et 3**) ou induites à la Doxycycline pour permettre l'expression des protéines GFP-MCM2 (**A, lignes 2 et 4**) ou GFP-MCM5 (**B, lignes 2 et 4**). Ces extraits ont été séparés sur gel SDS-PAGE et incubés avec l'anticorps anti-GFP (**A-B, lignes 1 et 2**), avec l'anticorps anti-MCM2 (**A, lignes 3 et 4**) ou avec l'anticorps anti-MCM5 (**B, lignes 3 et 4**) pour confirmer l'expression des protéines MCM2 ou MCM5 étiquetées GFP. Les cellules induites à la Doxycycline pour l'expression des protéines GFP-MCM2 (**C-D**) et GFP-MCM5 (**E-F**) ont été fixées et marquées pour une observation par IF en utilisant un anticorps anti-GFP (**D, F**). Les cellules ont également été visualisées par contraste de phase (**C, E**). Barre d'échelle = 30 μ m. (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) disponible en Annexe 1)

Par la suite, nous avons recherché les protéines qui pouvaient interagir avec les protéines MCM2 et MCM5 en effectuant une quantification des partenaires d'interaction de chacune des protéines MCM grâce à l'approche SILAC. Les protéines MCM2 ou MCM5 étiquetées GFP en N-terminal ont été immunoprécipitées en utilisant des billes d'agarose GFP-TRAP. Pour contrôler l'efficacité de nos IP, nous nous sommes assurés de la déplétion de toutes les protéines MCM étiquetées du lysat cellulaire (Figures 22A-B). Nous avons comparé les immunoprécipités issus des cellules non induites (milieu léger, R0K0), et ceux issus des cellules induites à la Doxycycline (milieu moyen, R6K4) (Figure 22C). Cette approche expérimentale permet une discrimination des interactions spécifiques et des protéines contaminantes.

L'analyse de l'expérience d'IP de MCM2 a permis l'identification de toutes les protéines du complexe MCM (MCM2 à MCM7) (Figure 22D). Cela indique donc que la protéine GFP-MCM2 semble être correctement assemblée au sein du complexe MCM. Plusieurs autres protéines ont également été immunoprécipitées avec MCM2 (Figure 22F-G). Parmi ces protéines, nous avons repéré plusieurs avec un ratio d'enrichissement relativement élevé comme la protéine MCMBP (*MCM binding protein*), ou plusieurs protéines chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines comme les protéines HSP (*Heat shock protein*) et la protéine T-complex 1 ou complexe CCT (Figure 22F). De telles protéines sont souvent identifiées comme interagissant avec des protéines exprimées de façon exogène, et sont le plus souvent des interactants spécifiques facilitant le repliement des protéines en excès. Une étude de ces protéines dans le cadre de la compréhension des interactions normales des protéines endogènes nous semble donc moins intéressante.

L'analyse de l'expérience d'IP de MCM5 nous a permis de n'identifier que la protéine MCM3 et les histones en co-IP (Figure 22E). Il semblerait alors la protéine GFP-MCM5 interagirait seulement avec son partenaire direct et que cette protéine ne semblerait pas être reconnue pour former un complexe MCM fonctionnel.

Afin de caractériser les interactions protéiques modifiées en réponse aux dommages à l'ADN, nous avons décidé de continuer nos expériences uniquement avec la protéine

MCM2. En effet, il semblerait que ce soit la seule de nos deux protéines à intégrer le complexe MCM (Figure 22).

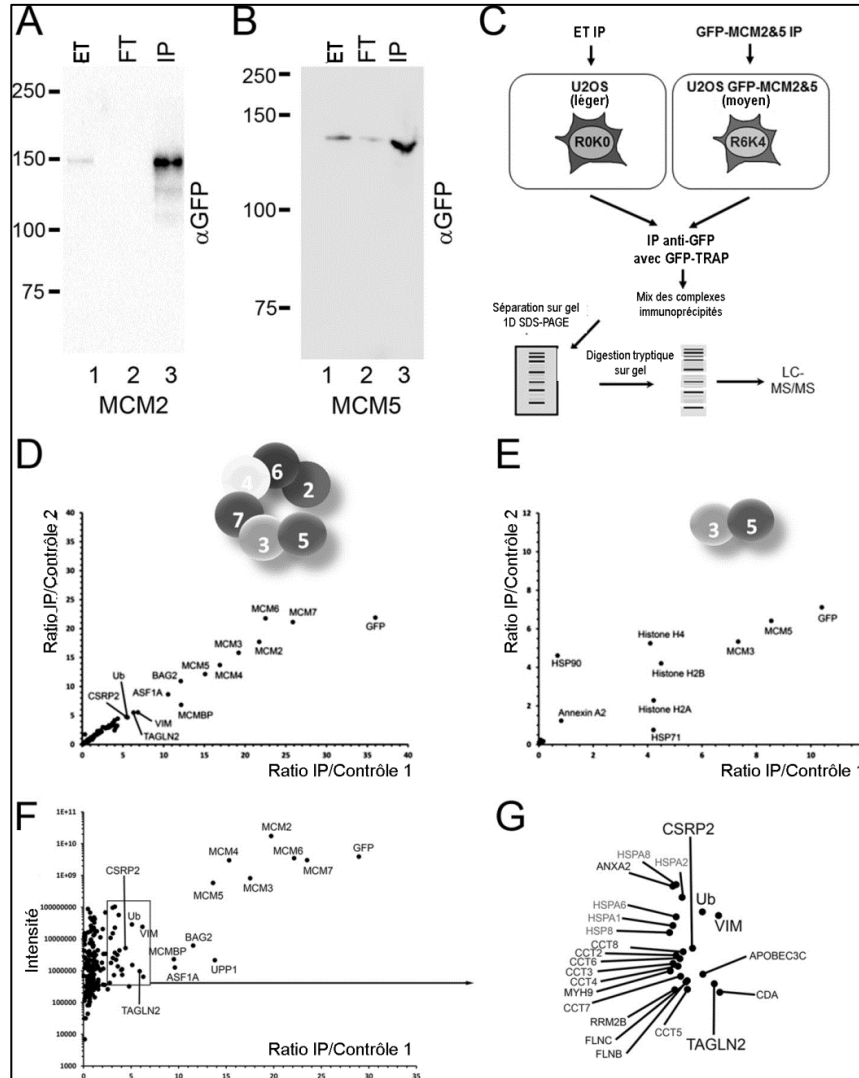


Figure 22. Purification par affinité et analyse par spectrométrie de masse des protéines GFP-MCM2 et GFP-MCM5 pour identifier les partenaires d'interaction. Les protéines (A) MCM2 et (B) MCM5 étiquetées GFP en N-terminal ont été immunoprécipitées en utilisant des billes d'agarose GFP-TRAP. La déplétion des protéines MCM marquées des extraits totaux (ET) a été vérifiée. (C) Les cellules marquées par culture en milieu SILAC ont été utilisées pour comparer les IP par GFP des cellules non induites (milieu léger, R0K0) et celles des cellules induites à la Doxycycline (milieu moyen, R6K4). Les immunoprécipités sont ensuite combinés et séparés sur SDS-PAGE. Chaque ligne du gel a été coupée en 8 bandes avant d'être chacune digérée à la trypsine. Les peptides extraits ont été analysés par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Les ratios M/L de deux expériences indépendantes pour GFP-MCM2 (D) et GFP-MCM5 (E) sont comparés (tracés point par point) et les protéines ayant un ratio supérieur à celui des contaminants sont identifiées. (F) Les ratios moyens M/L des deux expériences GFP-MCM2 (purifiées par affinité et analysées par spectrométrie de masse) ont été tracés point par point comparativement aux intensités totales. (G) Zoom réalisé sur la région entourée en (F) pour l'identification des protéines ayant un ratio proche de celui des contaminants. (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) disponible Annexe 1)

4.1.3 Identification des partenaires d'interaction des protéines MCM en réponse à l'étoposide.

Pour rappel, l'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II générant des CDB au niveau de l'ADN des cellules (Montecucco and Biamonti 2007). Afin d'identifier les interactions pouvant être modulées par un traitement à l'étoposide, nous avons effectué la même expérience que précédemment en utilisant un marquage triple au SILAC. Nous avons alors réalisé des IP contre les protéines étiquetées GFP issues des cellules non induites (milieu léger, R0K0, contrôle), des cellules induites à la Doxycycline (milieu moyen, R6K4), et des cellules induites à la Doxycycline et traitées à l'étoposide. Ces dernières ont été traitées à l'étoposide pendant 1 heure puis lavées et laissées au repos pendant 15, 60, et 240 min après un changement de milieu (Figure 23A). Cette approche expérimentale va permettre une quantification des interactions qui vont être modulées positivement ou négativement pendant la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN causés par l'étoposide. On peut voir que les niveaux de GFP-MCM2 immunoprécipités sont similaires dans chaque condition (Figure 23B) et que le modèle général d'identification est resté similaire tout au long de l'expérience (Figures 23C-D). Toutes les protéines du complexe MCM ont pu être identifiées à chaque temps de récupération (15, 60 et 240 minutes) avec une stœchiométrie similaire. Cela nous permet de confirmer la stabilité du complexe MCM suite à un traitement à l'étoposide (Figure 23D). Nous avons ainsi pu identifier plusieurs protéines interagissant avec le complexe MCM, dont les protéines NPM1 (Nucléophosmine), BAG2 (*BAG family molecular chaperone regulator 2*), UPP1 (*Uridine phosphorylase 1*) et HDAC10 (Histone désacétylase 10). Cependant, toutes ces interactions restent inchangées suite au traitement à l'étoposide (Figure 23D). L'ubiquitine a également été identifiée comme une protéine enrichie. Néanmoins, la raison la plus probable serait qu'une ou plusieurs protéines du complexe MCM soient ubiquitinylées. Nous avons également pu identifier quatre protéines dont l'interaction avec le complexe MCM semble être modulée suite au traitement à l'étoposide (Figure 23B).

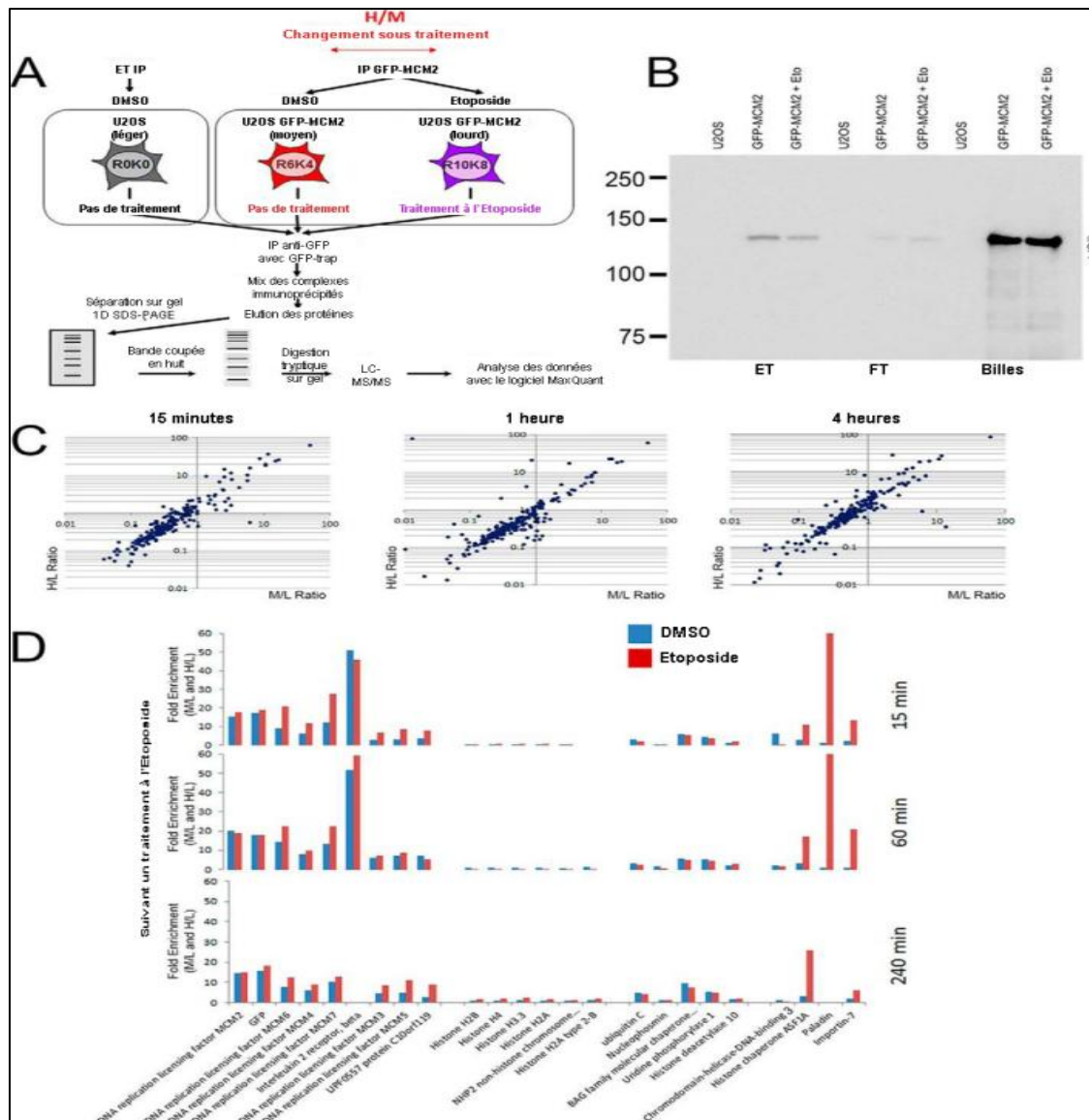


Figure 23. Interactions dynamiques du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN. (A) Représentation schématique de l'expérience pour identifier et quantifier les interactions de la protéine GFP-MCM2 en réponse à un traitement de 50 μ M d'étoposide pendant 1 heure. Les cellules marquées par culture en milieu SILAC ont été utilisées pour comparer les IP contre les étiquettes GFP des cellules non induites (milieu léger, R0K0), des cellules induites à la Doxycycline pour l'expression de la protéine GFP-MCM2 et traitées au DMSO (milieu moyen, R6K4), et des cellules induites pour l'expression de GFP-MCM2 et traitées à 50 μ M d'étoposide pendant 1 heure (milieu lourd, R10K8). Les immunoprécipités de chaque expérience ont été combinés et séparés sur gel SDS-PAGE. Chaque ligne a été coupée en 8 bandes avant d'être digérée sur gel par la trypsine. Les peptides ont ensuite été analysés par LC-MS/MS. **(B)** Les extraits totaux des cellules (ET) et les immunoprécipités issus du contrôle, des cellules GFP-MCM2 ayant subi une simulation de traitement au DMSO et des cellules GFP-MCM2 traitées à l'étoposide (50 μ M pendant 1 heure), ont été séparés sur gel SDS-PAGE et incubés avec un anticorps anti-GFP. **(C)** Ratios des protéines interagissant avec GFP-MCM2 issues des cellules ayant subi une simulation de traitement au DMSO comparées aux cellules traitées pendant 1 heure à 50 μ M d'étoposide, suivi d'une récupération de 15, 60 ou 240 minutes (H/L, axe y). **(D)** Identification des protéines identifiées avec un ratio M/L (bleu) et les ratios H/L (rouge) sans les contaminants à 15, 60 ou 240 minutes en réponse à un traitement à l'étoposide. (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) disponible en Annexe 1)

Pour trois de ces protéines, on observe une augmentation d'interaction avec la protéine MCM2 : la chaperonne d'histone ASF1A, la Tyrosine phosphatase PALD1 (Paladin) et la protéine IMP7 (Importine 7). En revanche, la protéine CHD3 (*Chromodomain helicase DNA binding protein 3*) a montré une diminution dans son interaction en réponse à un traitement à l'étoposide.

4.1.4 Identification des modifications post-traductionnelles (PTMs) des protéines MCM en réponse à l'étoposide

Nos expériences de spectrométrie de masse ont permis d'identifier plusieurs partenaires d'interaction de la protéine MCM2. De plus, à partir de nos expériences de spectrométrie de masse, il a été possible de détecter des PTMs sur les protéines immunoprécipitées et plus particulièrement des modifications par phosphorylation du complexe MCM (Figure 24A, cercle vert). Une analyse plus approfondie de ces sites de phosphorylation nous a permis de regrouper les phosphorylations suivant trois sites consensus distincts (Figures 24B-D). Le motif SSP des protéines MCM est connu pour être phosphorylé par le complexe CDC7/DBF4, complexe responsable de l'activation du complexe MCM induisant l'initiation de la réplication de l'ADN (Sheu and Stillman 2006). Cependant, nos résultats n'ont montré aucune augmentation de phosphorylation sur ces sites SSP, indiquant ainsi que le traitement à l'étoposide n'entraînerait pas d'activation de l'initiation de la réplication de l'ADN ou de la synchronisation des cellules en phase S (Figure 24B). Le motif (E/D)(S/T)(E/D)EE correspond au motif de phosphorylation canonique de la protéine CK2, kinase qui présente des fonctions pléiotropes et qui peut également être impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADN (Kulartz et al. 2004). La plupart de ces sites n'ont montré aucune augmentation de phosphorylation (Figure 24C). Cependant, de façon intéressante, trois sites de phosphorylation, un sur chacune des protéines MCM2, MCM3 et MCM6, suivent les sites consensus SQ. Les sites SQ sont des cibles pour les kinases ATM, ATR et DNA-PK (O'Neill et al. 2000; S. T. Kim et al. 1999) lors de la signalisation des dommages à l'ADN. La phosphorylation de ces sites a été

trouvée augmentée, suggérant ainsi que les dommages à l'ADN induits par un traitement à l'étoposide entraînent une phosphorylation du complexe MCM (Figure 24D).

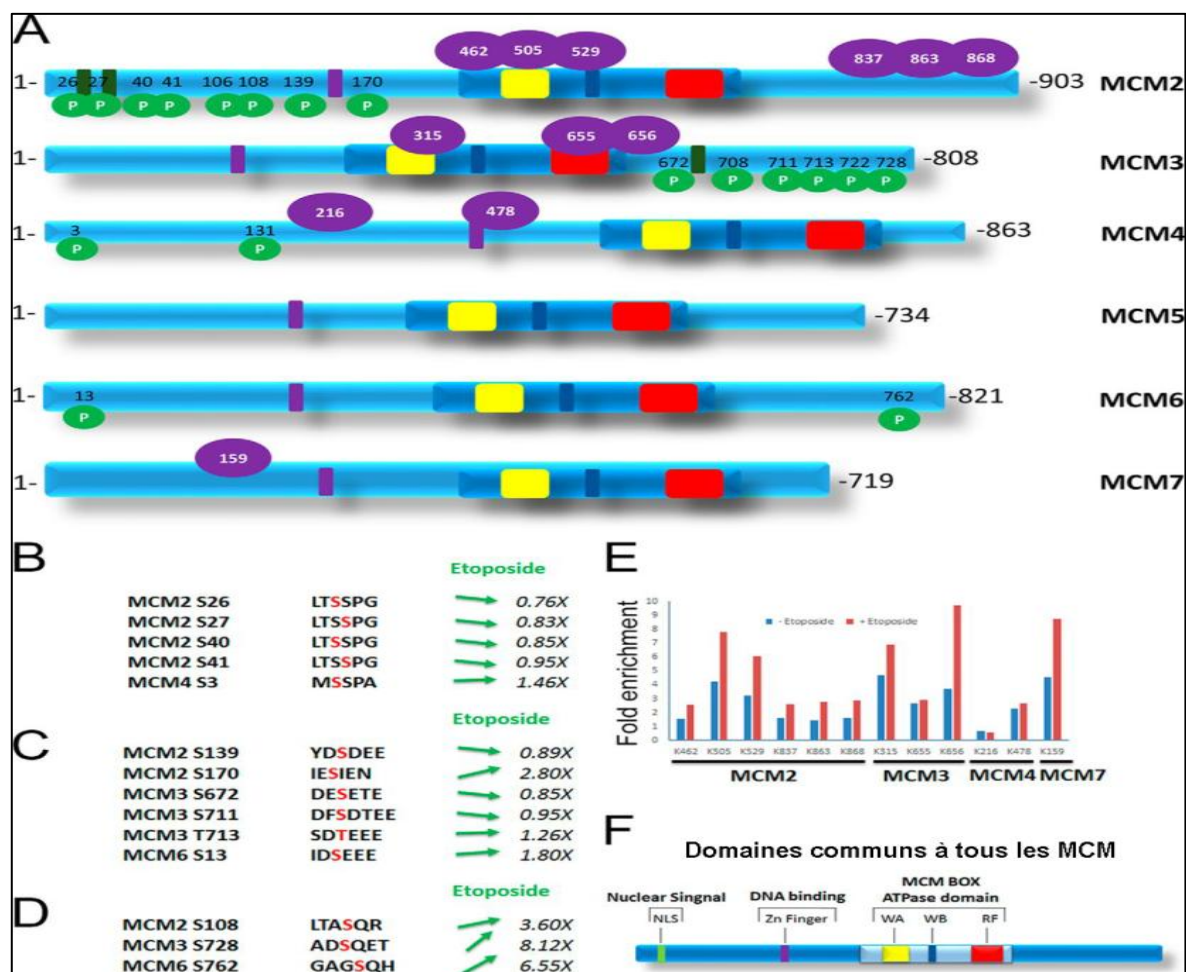


Figure 24. Identification des modifications post-traductionnelles (PTMs) sur les protéines du complexe MCM. (A) Identification des PTMs utilisant les phosphorylations sur Sérine ou Thréonine (cercle vert) ou la présence du dipeptide de Glycine Gly-Gly (cercle violet) comme des modifications variables indiquant les modifications du complexe MCM. Les ratios H/M indiquant un changement dans la présence des modifications suivant un traitement à l'étoposide sont indiqués pour une phosphorylation sur la Sérine des motifs SSP (B), pour une phosphorylation Sérine ou Thréonine sur les motifs (E/D)(S/T)(E/D)EE (C) et pour une phosphorylation sur la Sérine des motifs SQ (D). (E) Les peptides ubiquitinylés sur les protéines MCM issues des cellules ayant subi une simulation de traitement au DMSO représentent les ratios M/L (bleu) et ceux ubiquitinylés sur les protéines MCM issues des cellules traitées à 50 μ M d'étoposide pendant 1 heure représentent les ratios H/L (rouge). Cela permet de quantifier l'abondance de la signature dipeptidique Gly-Gly provenant des modifications de l'ubiquitine sur les protéines MCM. (F) Les domaines trouvés dans les protéines MCM comme montrés en A inclus un signal de localisation nucléaire (NLS), un doigt de Zinc (Zn Finger), un domaine ATPase au sein des régions Walker A et B ainsi qu'un doigt d'Arginine (RF). (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) en Annexe 1)

Finalement, parce que l'ubiquitine a été identifiée comme une protéine interagissant avec le complexe MCM, la présence d'un dipeptide de Glycine (Gly-Gly), une des modifications induite par l'ubiquitine, a été étudiée (Hershko et al. 1983; Marotti et al. 2002). Il a été possible d'identifier 12 sites d'ubiquitination sur les protéines MCM (Figure 24A, cercle violet). La quantification de cette modification suite au traitement à l'étoposide a montré que dix de ces douze sites d'ubiquitination possibles étaient augmentés en réponse aux dommages à l'ADN (Figure 24E).

4.1.5 Confirmation des changements d'interaction en réponse à l'étoposide

Pour confirmer les changements d'interaction observés suite à la présence de dommages à l'ADN (Figure 23D), des IP de GFP-MCM2 ont été effectuées dans des cellules traitées soit au DMSO, soit à l'étoposide pendant 1 heure, lavées puis laissées au repos pendant 1 et 4 heures dans du milieu frais (Figure 25). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et des immunobuvardages des extraits totaux ont été réalisés avec des anticorps anti-GFP et anti-ASF1A. Ces derniers n'ont montré aucun changement dans la quantité totale de protéines présentes (Figure 25A, lignes 1, 3 et 5). Cependant, une augmentation de la quantité d'ASF1A a été observée suite à l'IP de la protéine GFP-MCM2 (Figure 25A, comparaison des lignes 2, 4 et 6), confirmant ainsi l'augmentation de l'interaction entre le complexe MCM et la protéine ASF1A. Pour confirmer la présence de dommages à l'ADN, la phosphorylation de H2AX sur la Sérine 139 (γ H2AX) a été évaluée avec et sans traitement à l'étoposide (Figure 25B, ET). Le traitement à l'étoposide a, en effet, provoqué une augmentation de phosphorylation de H2AX (Figure 25B, comparaison de la ligne 3 aux lignes 1 et 2). Cependant, au regard de l'intensité du signal, la quantité d'histones présents paraît faible (Figure 25B).

Cette différence pourrait être expliquée par la méthode d'extraction qui a été initiée par une lyse au tampon Triton X-100 1%. L'utilisation de ce dernier ne permet sans doute pas une forte extraction des protéines chromatinienne. Nous avons alors décidé d'utiliser un tampon de lyse plus fort, le tampon RIPA. En comparant la quantité des histones H2AX extraite entre les deux conditions (Figure 25B-C, ET), il semblerait que le tampon RIPA ait

pu solubiliser une plus grande quantité d'histones. Pour déterminer si l'interaction entre le complexe MCM et ASF1A pourrait être associée à la chromatine, la protéine MCM2 a été immunoprécipitée à partir de cellules traitées pendant 1 heure au DMSO ou à l'étoposide (50 μ M) et lysées soit au Triton X-100 1%, soit au RIPA. Des immunobuvardages avec un anticorps anti-GFP montrent que la majorité des protéines MCM2 ont été trouvées dans l'extraction au Triton X-100 1% (Figure 25B). Cependant, l'interaction avec ASF1A semblait principalement être observée lorsque les protéines étaient extraites avec le tampon RIPA (Figure 25C). Cela suggère que même si la majeure partie du complexe MCM n'est pas nécessairement associée à la chromatine, l'association entre ASF1A et MCM2 semble l'être.

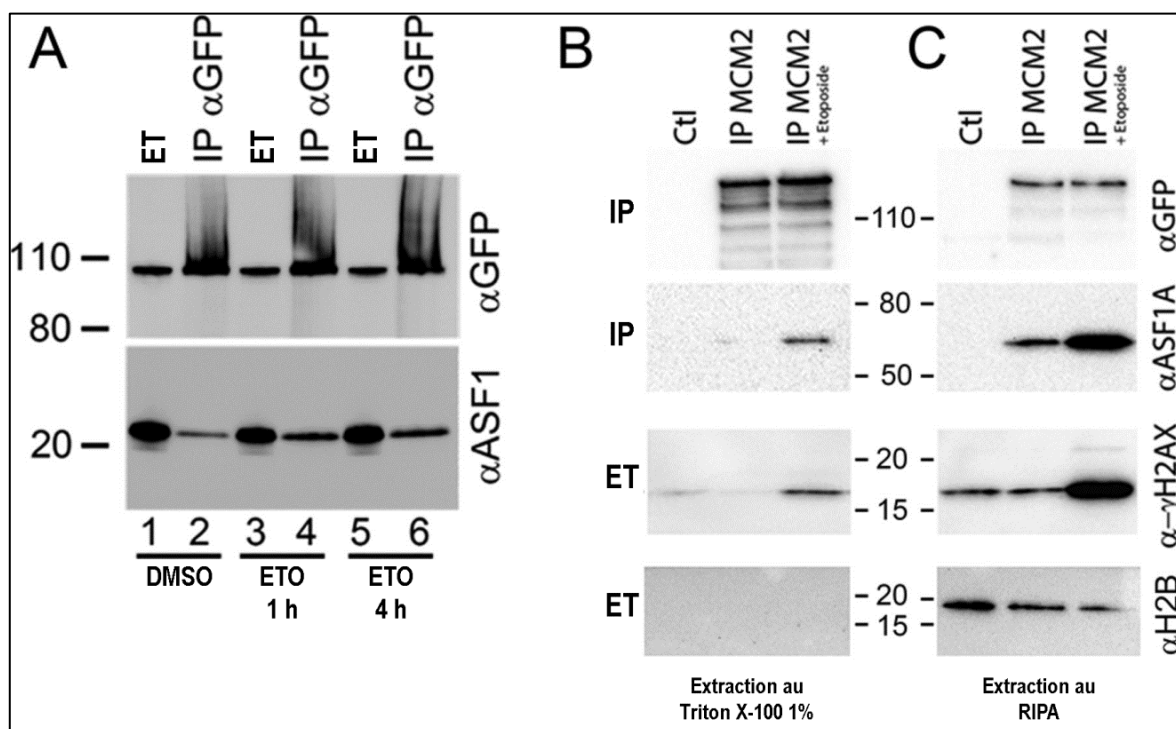


Figure 25. Les interactions entre les protéines ASF1A et MCM2 sont augmentées à la suite de dommages à l'ADN. (A) Les cellules U2OS Flp-In exprimant la protéine GFP-MCM2 subissent une simulation de traitement au DMSO (lignes 1 et 2) ou sont traitées avec 50 μ M d'étoposide pendant 1 heure suivi d'une récupération de 1 heure (lignes 3 et 4) ou 4 heures (lignes 5 et 6). Les extraits cellulaires totaux (ET) ont été immunoprécipités avec des billes d'agarose GFP-TRAP et révélés avec un anticorps anti-GFP (en haut) ou un anticorps anti-ASF1A (en bas). Une expérience similaire a été réalisée dans le but de comparer les extraits totaux préparés en utilisant un tampon Triton X-100 1% (B) ou un tampon RIPA (C). Les immunoprécipités (IP) ont été révélés avec des anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de la protéine H2AX sur sa Sérine 139 et l'histone H2B. (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) en Annexe 1)

4.1.6 Les protéines MCM et ASF1A interagissent à la chromatine en réponse à l'étoposide

Pour vérifier si l'interaction entre le complexe MCM et la protéine ASF1A est associée à des sites de dommages à l'ADN, nous avons cherché à évaluer la localisation de MCM2 et ASF1A dans les cellules avant et après dommages à l'ADN. Les dommages causés par l'ADN ont été induits par un traitement à l'étoposide à une dose plus faible que celle utilisée au cours des expériences d'interaction. En effet, le signal de γ H2AX était trop élevé et diffus dans les cellules suite à des doses d'étoposide plus élevées. En absence de dommages à l'ADN, MCM2 et ASF1A ont été détectées dans tout le noyau mais exclues du nucléole (Figures 26C, K) et avec peu ou pas de signal pour γ H2AX (Figures 26B, J). Après un traitement pendant 1 heure à 50 μ M d'étoposide, une forte augmentation du signal pour γ H2AX a été observée. De façon intéressante, nous avons trouvé une colocalisation partielle de MCM2 et γ H2AX (Figure 26H) dans certains foyers présents au sein de certaines cellules. ASF1A a, quant à elle, montré un effet encore plus grand sur sa colocalisation avec γ H2AX suite au traitement à l'étoposide (Figure 26P). Comme toutes les cellules ont montré une colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A avec la protéine γ H2AX, nous avons compté le pourcentage de cellules présentant trois foyers de colocalisation ou plus à différents temps de récupération après traitement à 50 μ M d'étoposide, et ce pour les deux protéines MCM2 et ASF1A (plus de 100 cellules par temps et trois expériences indépendantes). Le nombre de foyers a été sélectionné pour éviter de compter des événements aléatoires. Dans les deux cas, nous avons trouvé une augmentation significative de la colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A avec γ H2AX, ce qui confirmerait la présence de ces protéines sur les sites de dommages à l'ADN.

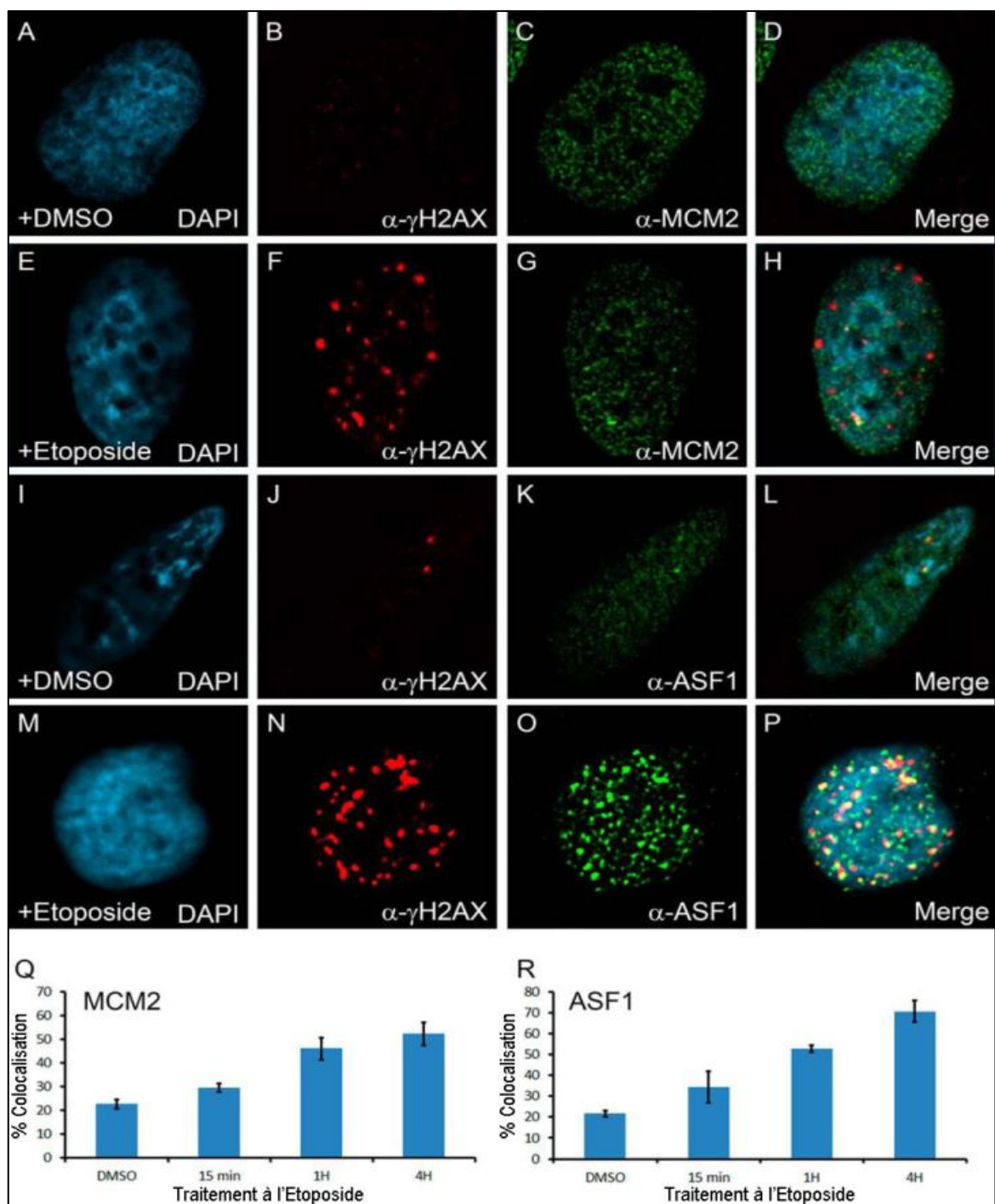


Figure 26. Colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A aux sites de dommages à l'ADN. Les cellules U2OS ont été cultivées sur des lamelles de verres. Elles ont subi une simulation de traitement au DMSO (A-D, I-L) ou ont été traitées avec 1 μ M d'étoposide pendant 1 heure (E-H, M-P). Les cellules ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde et marquées pour des expériences d'immunofluorescence avec un anticorps anti- γ H2AX (B, F, J, N), un anticorps anti-MCM2 (C, G) ou un anticorps anti-ASF1A (K, O). Les fusions des images pour les différentes conditions expérimentales sont montrées (D, H, L, P). Le pourcentage des cellules avec 3 foyers de colocalisation ou plus à différents temps de repos suivant un traitement à l'étoposide pour MCM2 (Q) et ASF1A (R) est représenté sous forme d'un diagramme en bâtons (plus de 100 cellules pour chaque temps, n=3). (Figure adaptée de (Drissi et al. 2015) disponible en Annexe 1)

4.2 La déstabilisation du complexe MCM module la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par l'étoposide

Nos résultats précédents ont suggéré une implication du complexe MCM dans la réponse aux dommages à l'ADN. Nous étions arrivés à cette hypothèse, d'une part à cause de la colocalisation de la protéine MCM2 sur les foyers nucléaires de γ H2AX et d'autre part, en raison d'un changement de localisation des protéines de la réparation de l'ADN et des protéines MCM vers la chromatine en réponse à un traitement à l'étoposide. Nous avons alors cherché à déterminer l'impact d'une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 sur les cellules en réponse aux CDB induites par l'étoposide.

4.2.1 Une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 n'affecte pas la croissance cellulaire

Nous avons alors investigué l'impact d'une diminution des protéines MCM sur la croissance cellulaire avec différents shARN dirigés contre les protéines MCM2 (shMCM2) ou MCM3 (shMCM3) dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome U2OS. Après avoir généré des lignées cellulaires stables exprimant des shARN dirigés contre les protéines MCM2 ou MCM3, nous avons confirmé la diminution des protéines MCM2 (Figure 27A) et MCM3 (Figure 27B) dans leur lignée cellulaire respective par immunobuvardage.

Nous avons réalisé des tests de croissance cellulaire sur ces cellules U2OS shContrôle, shMCM2 et shMCM3. Les cellules, implantées au temps 0, ont été comptées après 24, 48 et 72 heures. Il n'apparaît alors pas de différence entre les cellules U2OS shMCM2 ou shMCM3 comparativement à la lignée U2OS shContrôle (Figure 27C). Cependant, une diminution des protéines de la réplication pouvant entraîner un arrêt du cycle cellulaire en phases S (J. M. Kim et al. 2002), nous avons alors étudié le cycle cellulaire de nos lignées. Les cellules ont été récoltées puis fixées à l'éthanol avant d'être marquées à l'IP*, un agent intercalant des acides nucléiques. Les cellules ainsi marquées ont alors pu être discriminées par cytométrie en flux selon leur avancement dans le cycle cellulaire. Après comptage de 10,000 cellules, nous n'observons pas de modification du

cycle cellulaire lors d'une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 comparativement aux cellules contrôles (Figure 27D). Une diminution des protéines de réplication MCM2 ou MCM3 ne semble donc pas affecter la croissance cellulaire.

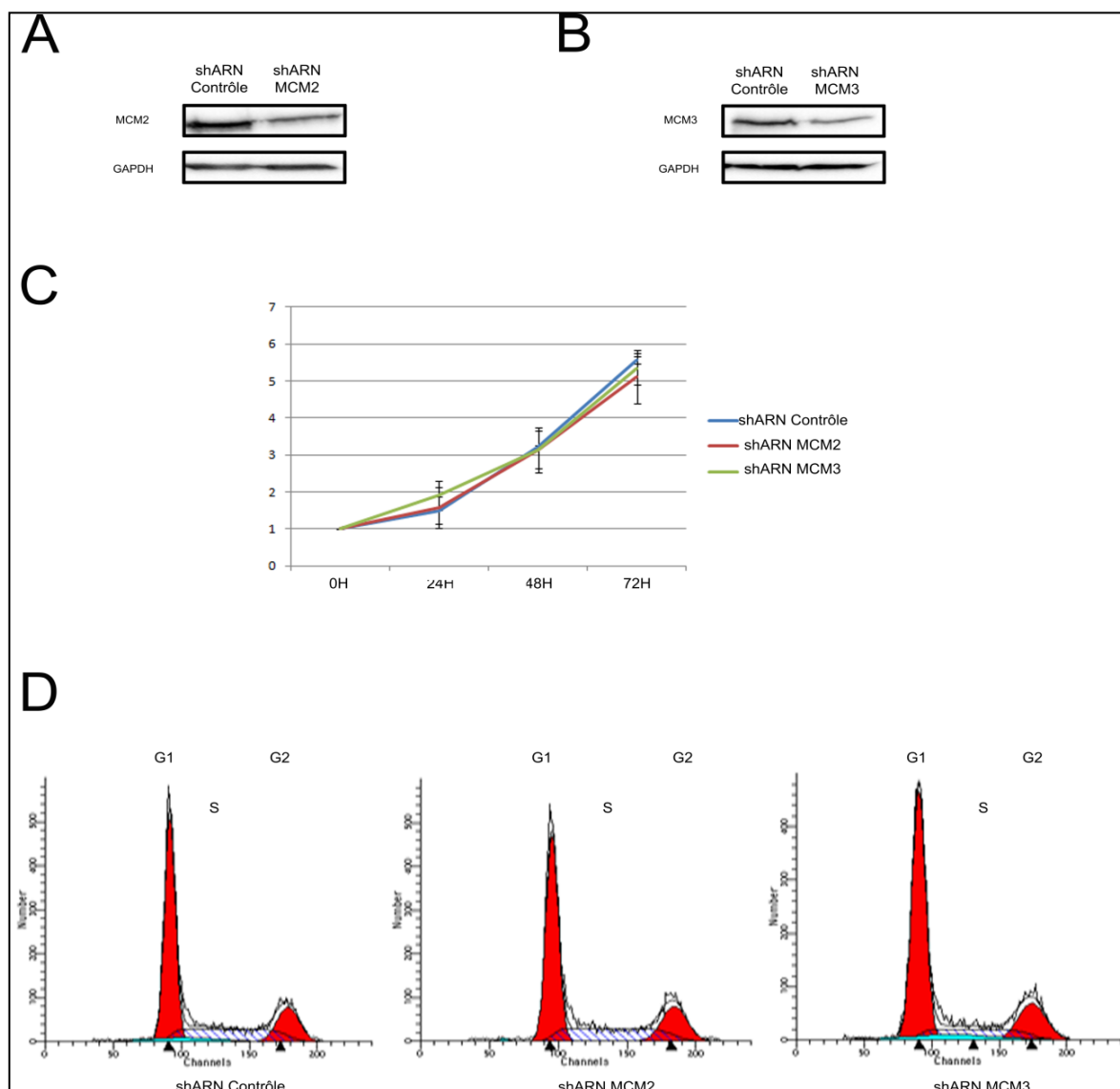


Figure 27. Contrôle des lignées cellulaires infectées par shARN. (A) Les extraits totaux (ET) des cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, MCM2 ou (B) MCM3 ont été séparés par gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages ont été réalisés pour permettre la révélation des protéines MCM2 (A), MCM3 (B) et GAPDH (A et B). Le même nombre de cellules a été implanté au temps 0. Elles ont ensuite, soit été (C) comptées après une croissance de 24, 48 et 72 heures pour réaliser des courbes de croissance cellulaire ou (D) fixées à l'éthanol, marquées à l'IP* et analysées par cytométrie en flux pour étudier la répartition du cycle cellulaire après 72 heures de croissance.

4.2.2 Les shARN ciblant les protéines MCM2 ou MCM3 déstabilisent le complexe MCM

En 2008, Ibarra et collaborateurs ont montré une diminution du niveau d'expression de toutes les protéines MCM après ARN interférence avec des siARN ciblant les protéines MCM2 ou MCM3 (Ibarra, Schwob, and Méndez 2008). Nous avons donc vérifié l'effet de nos shMCM2 et shMCM3 sur le niveau d'expression des autres protéines MCM. Nous avons alors observé qu'une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 par shARN dans des lignées cellulaires U2OS ne réduisait pas uniquement les protéines ciblées (MCM2 et MCM3 respectivement), mais également les protéines MCM3 (ou MCM2 respectivement), MCM5 et MCM7 (Figure 28). Ces résultats suggèrent que la diminution d'une seule protéine MCM pourrait déstabiliser le complexe MCM en entier, résultant possiblement en une dégradation des autres protéines MCM.

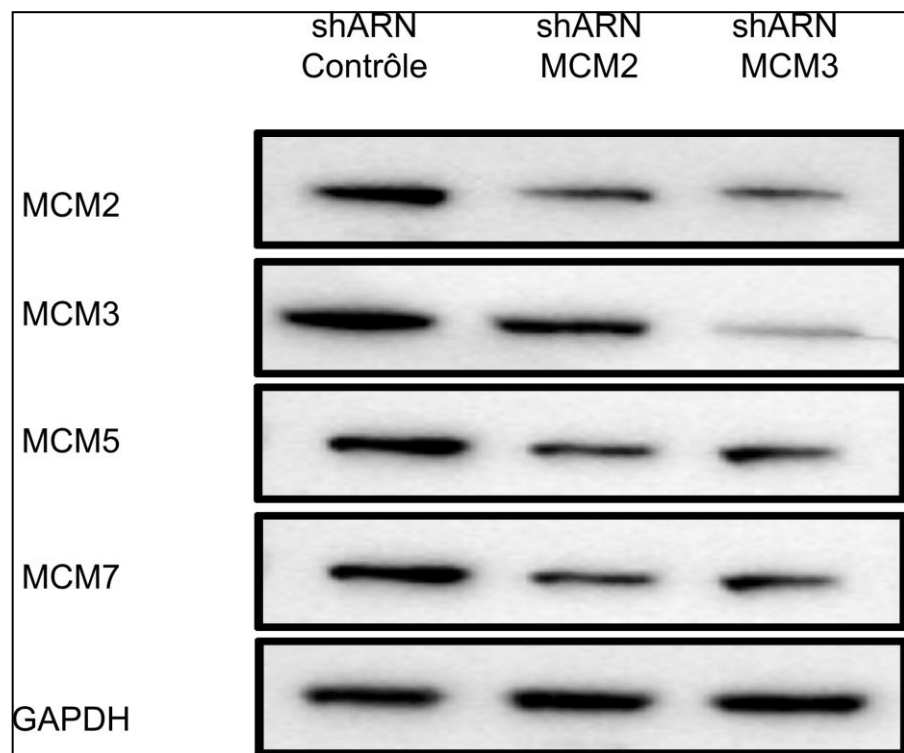


Figure 28. Analyse de l'expression du complexe MCM dans les cellules U2OS infectées avec les shARN contrôle ou ciblant les protéines MCM2 ou MCM3. Les extraits cellulaires totaux (ET) des cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, shMCM2 ou shMCM3 ont été séparés par gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages ont été réalisés puis révélés avec des anticorps anti-MCM2, anti-MCM3, anti-MCM5, anti-MCM7 et anti-GAPDH (n=3).

Une des réponses primaires suite à la présence de dommages double brin de l'ADN est la phosphorylation de H2AX sur sa Sérine 139 (X. Huang, Halicka, and Darzynkiewicz 2004). La phosphorylation de H2AX permet l'activation des mécanismes de réparation de la HR et de la NHEJ, le recrutement des protéines de réparation liées à ces mécanismes respectifs aux sites de CDB ainsi que l'activation de la signalisation des dommages à l'ADN (Stucki et al. 2005). Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'impact d'une déstabilisation du complexe MCM sur le niveau de phosphorylation de la protéine H2AX en réponse aux dommages induits par l'étoposide. Les lignées cellulaires U2OS shContrôle, shMCM2 ou shMCM3 ont été traitées pendant 1 heure avec 1 ou 10 μ M d'étoposide. Après 1 heure de traitement avec 10 μ M d'étoposide, une forte augmentation de la phosphorylation de H2AX est observée dans notre lignée cellulaire U2OS shContrôle. Cependant, cette phosphorylation de H2AX est plus faible lorsque le complexe MCM est déstabilisé (Figure 29). Ainsi, une diminution du complexe MCM induirait une réduction de la phosphorylation de H2AX en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide.

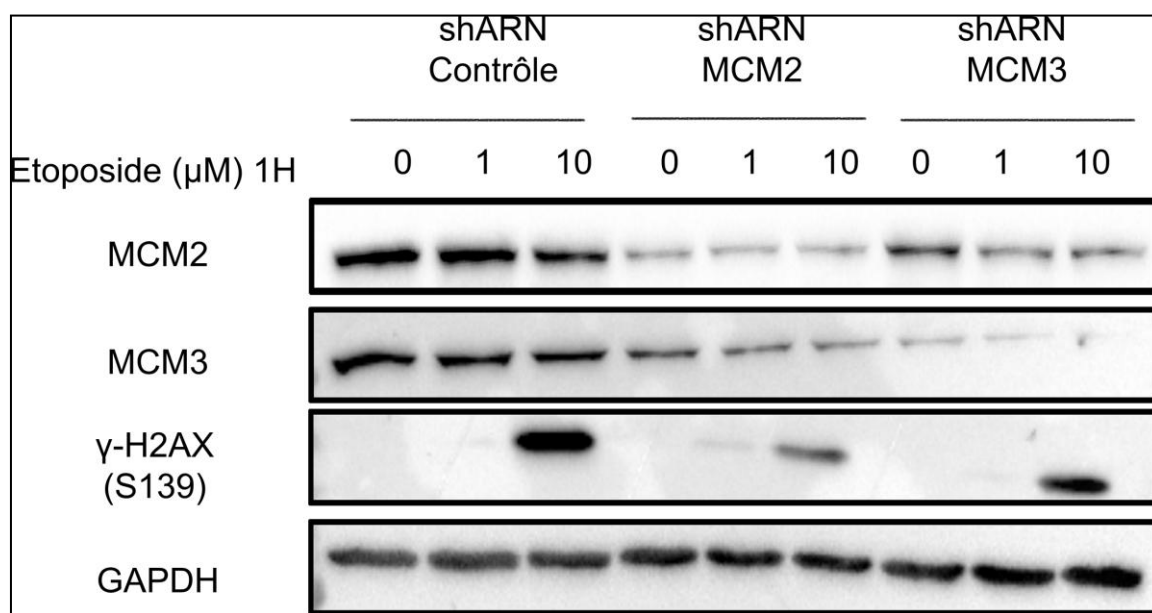


Figure 29. La déstabilisation du complexe MCM entraîne une diminution de phosphorylation de la protéine H2AX sur sa Sérine 139. Les cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 ont été traitées avec 1 ou 10 μ M d'étoposide pendant 1 heure et leurs extraits cellulaires totaux (ET) ont été séparés par gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages ont été réalisés puis révélés avec des anticorps anti-MCM2, anti-MCM3, anti- γ H2AX et anti-GAPDH (n=3).

4.2.3 La déstabilisation du complexe MCM altère la réponse aux dommages à l'ADN

Suite à la modification de phosphorylation de la protéine H2AX dans nos lignées cellulaires shMCM2 et shMCM3, nous avons cherché à confirmer ce résultat en étudiant la phosphorylation d'une autre protéine impliquée dans la signalisation des CDB : la phosphorylation de CHK2 sur sa Thréonine 68. CHK2 est une autre protéine pouvant être activée et jouant un rôle dans la réponse cellulaire aux CDB (Irene M. Ward, Wu, and Chen 2001; Buscemi et al. 2004). Nous avons donc analysé son niveau de phosphorylation dans nos lignées cellulaires U2OS infectées avec nos shARN. Pour cela, les cellules ont été traitées ou non avec 1 ou 10 μ M d'étoposide pendant 1 heure ou 19 heures. Dans les cellules U2OS shContrôle, CHK2 est phosphorylée sur sa Thréonine 68 en réponse à 50 μ M d'étoposide pendant 1 heure (Figure 30A). Dans les lignées U2OS shMCM2 ou shMCM3, cette phosphorylation est plus faible que celle observée dans la lignée contrôle (Figure 30A), comme ce qui a pu être observé avec H2AX (Figures 29 et 30A). Cependant, après un traitement de 19 heures à 10 μ M d'étoposide, la phosphorylation de CHK2 sur sa Thréonine 68 ne semble pas être affectée par la déstabilisation du complexe MCM (Figure 30B) alors que la protéine H2AX montre toujours une phosphorylation moindre dans les cellules shMCM2 ou shMCM3 (Figure 30B). De plus, un traitement de 1 μ M d'étoposide pendant 19 heures augmente fortement la phosphorylation de CHK2 à un niveau proche de celui obtenu après 10 μ M d'étoposide, augmentation qui n'est pas observée chez H2AX (Figure 30B).

La protéine CHK1 est également connue pour être impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN où elle est principalement activée en réponse à un stress génotoxique ou suite à la présence d'une CSB. Cependant elle peut également être activée en réponse aux CDB (Cuadrado et al. 2006). De plus, la présence d'un simple brin d'ADN au cours des mécanismes de réparation des CDB pourrait promouvoir la phosphorylation de CHK1 sur sa Sérine 345. Comme dans le cas de la protéine CHK2, nous avons observé une phosphorylation de la protéine CHK1 dans les cellules U2OS infectées par nos shARN après un traitement de 1 ou 10 μ M d'étoposide pendant 1 heure ou 19 heures. CHK1

apparaît moins phosphorylée en réponse à un traitement de 10 μM d'étoposide pendant 1 heure avec les shMCM2 ou shMCM3 comparativement à la lignée contrôle (Figure 30A). Un traitement de 1 μM d'étoposide n'affecte pas la phosphorylation de CHK1. Suite à un traitement de 19 heures à 1 μM d'étoposide, une augmentation de la phosphorylation de la Sérine 345 est observée. Cette dernière est similaire à celle obtenue après 10 μM d'étoposide et ce, dans nos trois lignées cellulaires. Cependant, cette phosphorylation reste toujours plus faible dans les U2OS shMCM2 et U2OS shMCM3 comparativement à la lignée contrôle quelle que soit la concentration d'étoposide.

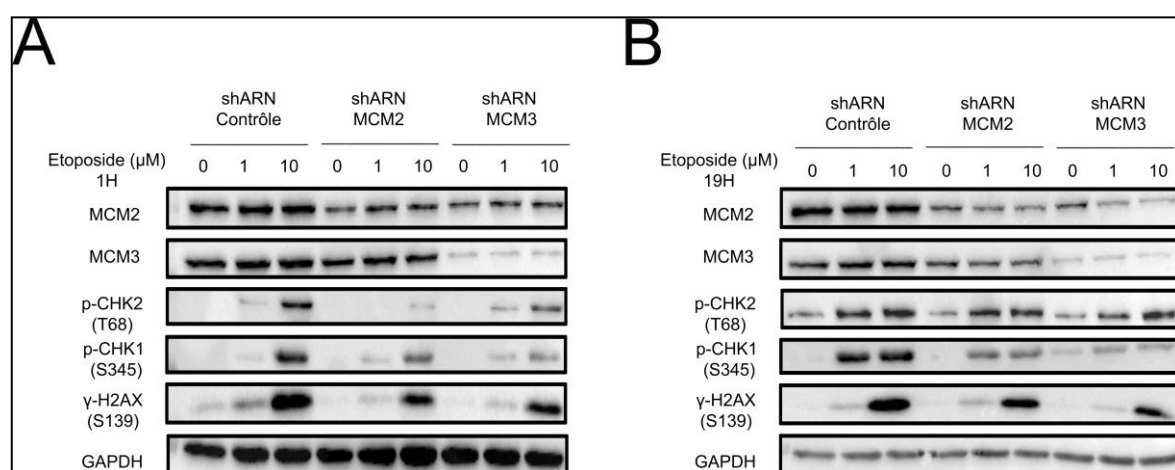


Figure 30. Effet d'une diminution du complexe MCM sur la réponse aux dommages à l'ADN. Les cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 ont été traitées avec 1 ou 10 μM d'étoposide pendant (A) 1 heure ou (B) 19 heures et leurs extraits cellulaires totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages ont été réalisés puis révélés avec des anticorps anti-MCM2, anti-MCM3, anti-p-CHK2 (T68), anti-p-CHK1 (S345), anti- γ H2AX et anti-GAPDH (n=3).

4.2.4 La déstabilisation du complexe MCM n'altère pas le cycle cellulaire ni la sensibilité des cellules à l'étoposide

Suite à la présence de dommages à l'ADN, la phosphorylation de CHK2 peut permettre un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 pour assurer une réparation correcte de l'ADN et prévenir la persistance des dommages au moment de la division cellulaire. Nos lignées cellulaires ont été traitées soit avec 10 μM d'étoposide pendant 1 heure puis cultivées dans du milieu frais pendant 19 heures (1 heure de traitement ne permettant

pas d'observer de changement dans le cycle cellulaire), soit pendant 19 heures avec 10 μ M d'étoposide.

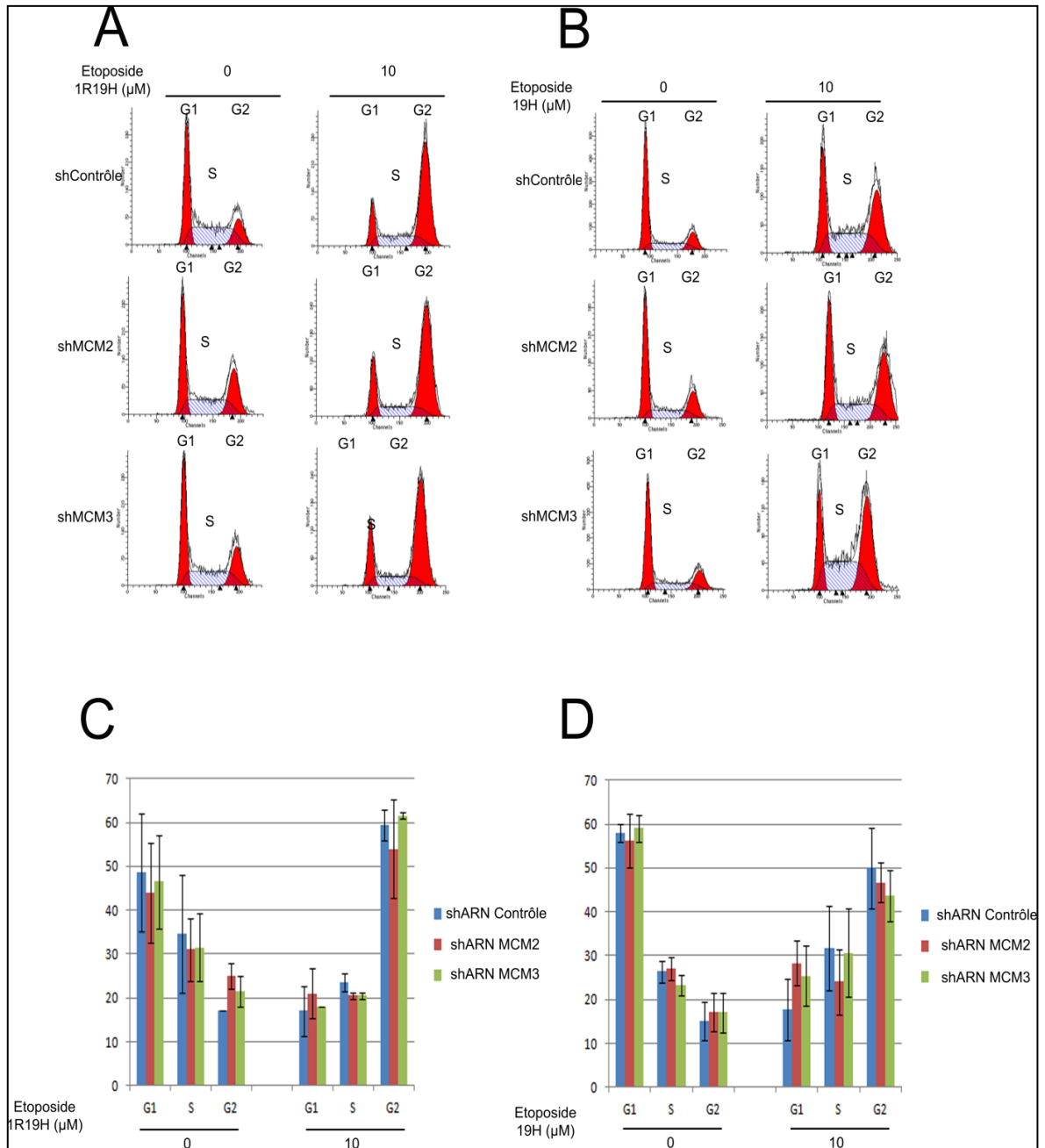


Figure 31. Effet d'une diminution du complexe MCM sur le cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. Les cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 ont été traitées, soit pendant 1 heure avec 10 μ M d'étoposide puis cultivées dans du milieu frais pendant 19 heures (**A, C**), soit pendant 19 heures avec 10 μ M d'étoposide (**B, D**). Les cellules ont ensuite été fixées à l'éthanol, marquées à l'IP* et analysées par cytométrie en flux où 10,000 cellules ont été comptées. Le pourcentage de cellules en phase G1, S et G2 en réponse ou non à un traitement soit de 1 heure à 10 μ M d'étoposide suivis de 19 heures de repos (**C**), soit de 19 heures avec 10 μ M d'étoposide (**D**) est représenté par un diagramme en bâtons.

Dans les deux cas, les cellules ont été récoltées puis fixées à l'éthanol avant d'être marquées à l'IP*. Les cellules ainsi marquées ont alors pu être discriminées par cytométrie en flux selon leur avancement dans le cycle cellulaire après comptage de 10,000 cellules. Après un traitement de 1 heure à 10 μ M d'étoposide suivi de 19 heures de repos, les trois lignées cellulaires ont présenté un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Figures 31A, C). Cet arrêt se produit également après 19 heures de traitement à 10 μ M d'étoposide (Figure 31B-C) mais semblerait moins important. Cependant, nous n'avons pas observé de modifications du cycle cellulaire lors d'une diminution des protéines MCM2 ou MCM3 comparativement aux cellules contrôles. Dans les deux cas, les cellules ont été stoppées en phase G2 et cette distribution des cellules est similaire pour toutes nos lignées cellulaires (Figure 31).

Nos lignées cellulaires U2OS shMCM2 et U2OS shMCM3 ne montrant pas d'altérations dans leur cycle cellulaire comparativement à la lignée contrôle suite à un traitement à l'étoposide, nous avons cherché à étudier l'impact d'une diminution du complexe MCM sur la sensibilité de nos lignées cellulaires en réponse à l'étoposide. L'étoposide est connu pour promouvoir la phosphorylation de la protéine P53 sur sa Sérine 15, promouvant l'apoptose. Un traitement de 1 heure avec 1 ou 10 μ M d'étoposide ne semble pas augmenter la phosphorylation de P53 sur sa Sérine 15 (Figure 32A) contrairement à 19 heures d'étoposide (Figure 32B). Cependant, en réponse à 19 heures de traitement à 10 μ M d'étoposide, le niveau de phosphorylation de P53 sur la Sérine 15 est plus faible dans nos lignées U2OS shMCM2 et U2OS shMCM3 comparativement à la lignée contrôle (Figure 32B).

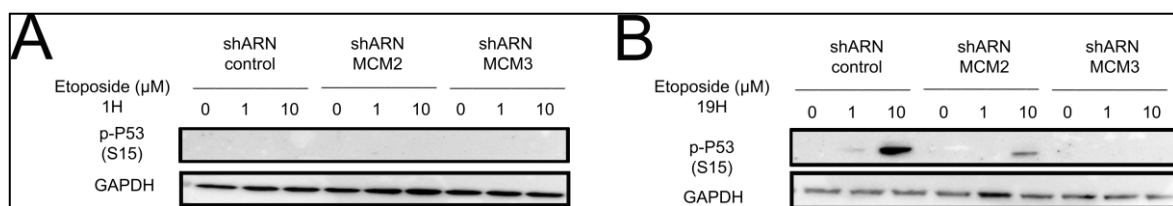


Figure 32. Effet d'une diminution du complexe MCM sur la phosphorylation de P53 en réponse aux dommages à l'ADN. Les cellules U2OS infectées par les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 ont été traitées avec 1 ou 10 μ M d'étoposide pendant **(A)** 1 heure ou **(B)** 19 heures et leurs extraits cellulaires totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages ont été réalisés puis révélés avec des anticorps anti-P53 (S15) et anti-GAPDH (n=3).

Par la suite, nous avons réalisé des courbes de croissance en réponse à l'étoposide. Un nombre de cellules identique de nos lignées cellulaires a été implanté dans des pétris et 24 heures après, les cellules ont été comptées (pour établir le temps 0) ou traitées avec 1 ou 10 μM d'étoposide pendant 24, 48 et 72 heures. A ces temps-là, les cellules ont également été comptées. La sensibilité de nos cellules shMCM2 (Figure 33A) et shMCM3 (Figure 33B) à de telles concentrations d'étoposide ne semble pas avoir été affectée par la diminution des protéines MCM (Figure 33). De plus la mortalité cellulaire paraît particulièrement élevée au cours de cette expérience ce qui nous a amené à diminuer les concentrations des traitements.

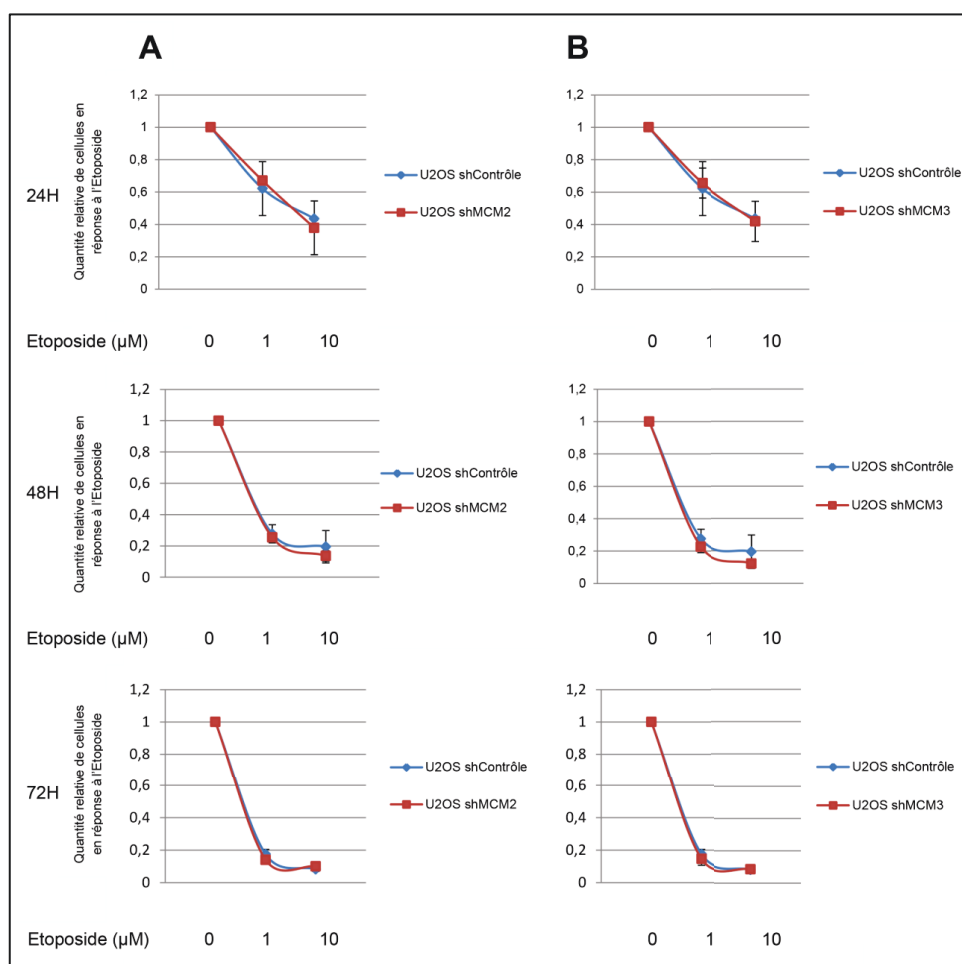


Figure 33. Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide (concentrations A). Un même nombre de cellules a été implanté au temps 0. Après 24 heures, les cellules ont été traitées ou non avec 1 ou 10 μM d'étoposide puis comptées afin de réaliser une quantification relative du nombre de cellules en réponse à 24, 48 et 72 heures d'étoposide. Les lignées cellulaires U2OS shMCM2 (**A**) et U2OS shMCM3 (**B**) ont été comparées à la lignée U2OS shContrôle. Tous les décomptes ont été effectués en même temps et la lignée U2OS shContrôle sert de référence dans les deux expériences.

Après avoir implanté de nouveau le même nombre de cellules, ces dernières ont cette fois été traitées avec 1, 10, 50, 100 et 1000 nM d'étoposide et comptées 48 (Figures 34A-B) et 72 heures (Figures 34C-D) plus tard. Le nombre de cellules en réponse à l'étoposide a été rapporté par rapport aux cellules non traitées. Cela permet ainsi d'obtenir une quantification relative de nos lignées cellulaires en réponse à l'étoposide. Comme dans le cas de nos lignées cellulaires traitées précédemment, aucune modification de la sensibilité n'est constatée dans nos cellules U2OS shMCM2 (Figures 34A, C) et U2OS shMCM3 (Figures 34B, D) comparativement à la lignée contrôle en réponse à ces nouvelles concentrations d'étoposide.

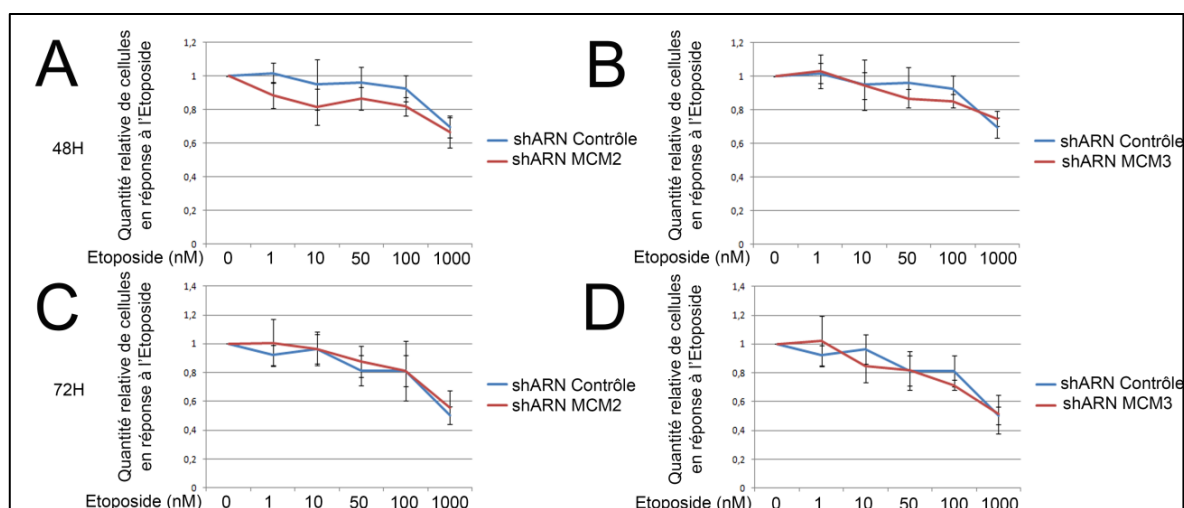


Figure 34. Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide (concentrations B). Un même nombre de cellules a été implanté au temps 0. Après 24 heures, les cellules ont été traitées ou non avec 1, 10, 50, 100 ou 1000 nM d'étoposide puis comptées afin de réaliser une quantification relative du nombre de cellules en réponse à 48 (A-B) et 72 heures (C-D) d'étoposide. Les lignées cellulaires U2OS shMCM2 (A-C) et U2OS shMCM3 (B-D) ont été comparées à la lignée U2OS shContrôle. Tous les décomptes ont été effectués en même temps et la lignée U2OS shContrôle sert de référence dans les deux expériences.

Nous avons confirmé ces résultats en réalisant des tests MTT. Cette approche colorimétrique permet de mesurer l'activité mitochondriale des cellules. Après avoir implanté le même nombre de cellules dans des plaques 6 puits etensemencé pendant 24 heures, les cellules sont traitées avec 1, 10, 50 et 100 nM d'étoposide pendant 48 heures. Les cellules ont été marquées au MTT pendant 2 heures puis la coloration a été mesurée par absorbance à 550 nm. Les valeurs obtenues pour chaque condition ont été comparées

aux valeurs des cellules non traitées, ce qui nous permet d'obtenir une quantification relative des cellules en réponse à différentes concentrations d'étoposide. Les tests MTT ne montrent pas de changement de sensibilité des cellules ayant un complexe MCM diminué en réponse à l'étoposide comparativement à la lignée contrôle (Figure 35).

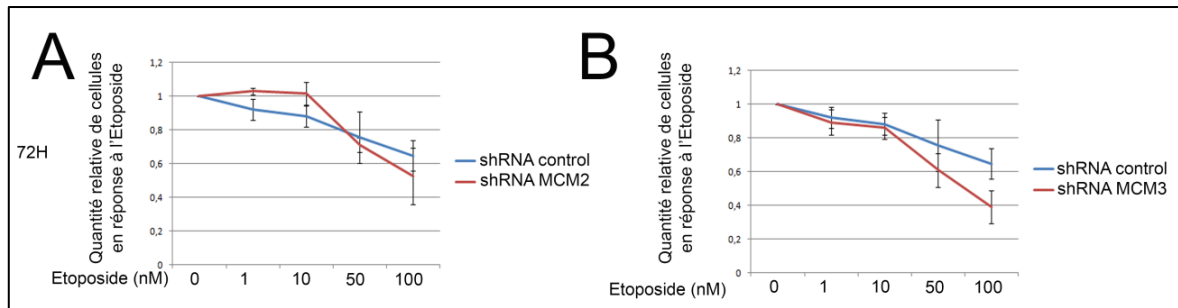


Figure 35. Effet d'une déstabilisation du complexe MCM sur la sensibilité des cellules en réponse à l'étoposide par test MTT. Un même nombre de cellules a été implanté au temps 0. Après 24 heures, les cellules ont été traitées avec 1, 10, 50 ou 100 nM d'étoposide puis marquées au MTT. La coloration a été analysée par mesure d'absorbance à 550 nm. Un ratio de l'absorbance des cellules traitées sur non traitées a permis de réaliser une quantification relative de la quantité de cellules en réponse à 48 heures d'étoposide. Les lignées cellulaires U2OS shMCM2 (A) et U2OS shMCM3 (B) ont été comparées à la lignée U2OS shContrôle. Tous les décomptes ont été effectués en même temps et la lignée U2OS shContrôle sert de référence dans les deux expériences.

4.2.5 La déstabilisation du complexe MCM entraîne une altération dans la Recombinaison Homologue mais pas dans la réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues

Après avoir étudié l'impact d'une diminution des protéines MCM sur la signalisation des CDB de l'ADN, nous nous sommes intéressés par la suite à l'impact d'une diminution du complexe MCM sur les mécanismes de réparation des CDB : la HR et la NHEJ. Afin d'étudier de façon spécifique ces mécanismes, deux plasmides ont été utilisés : les plasmides pDRGFP et pimΔEJ5 qui permettent l'étude de la HR et de la NHEJ respectivement (Bennardo et al. 2008).

Le plasmide pDRGFP (Figure 36) est composé de deux séquences codantes pour la protéine GFP : la première contient un site de restriction pour l'enzyme IScel associé à un codon stop (la protéine ne peut alors pas être exprimée), et la deuxième cette fois-ci tronquée (seule la partie C-terminale est présente). Suite à l'action de l'enzyme de

restriction I-SceI, non présente naturellement dans des cellules humaines, il y a clivage du site de restriction présent sur le plasmide au sein de la première séquence codante pour GFP, générant ainsi une CDB. La présence de cette CDB va alors favoriser l'utilisation de la HR et la deuxième séquence codante pour GFP va alors servir de brin matrice pour reconstituer une séquence GFP codant pour une protéine fonctionnelle. Si la CDB est réparée par la NHEJ, mécanisme pouvant entraîner des erreurs, la protéine GFP ne sera alors pas exprimée. C'est pourquoi nous utilisons le plasmide pimΔEJ5 pour étudier la NHEJ.

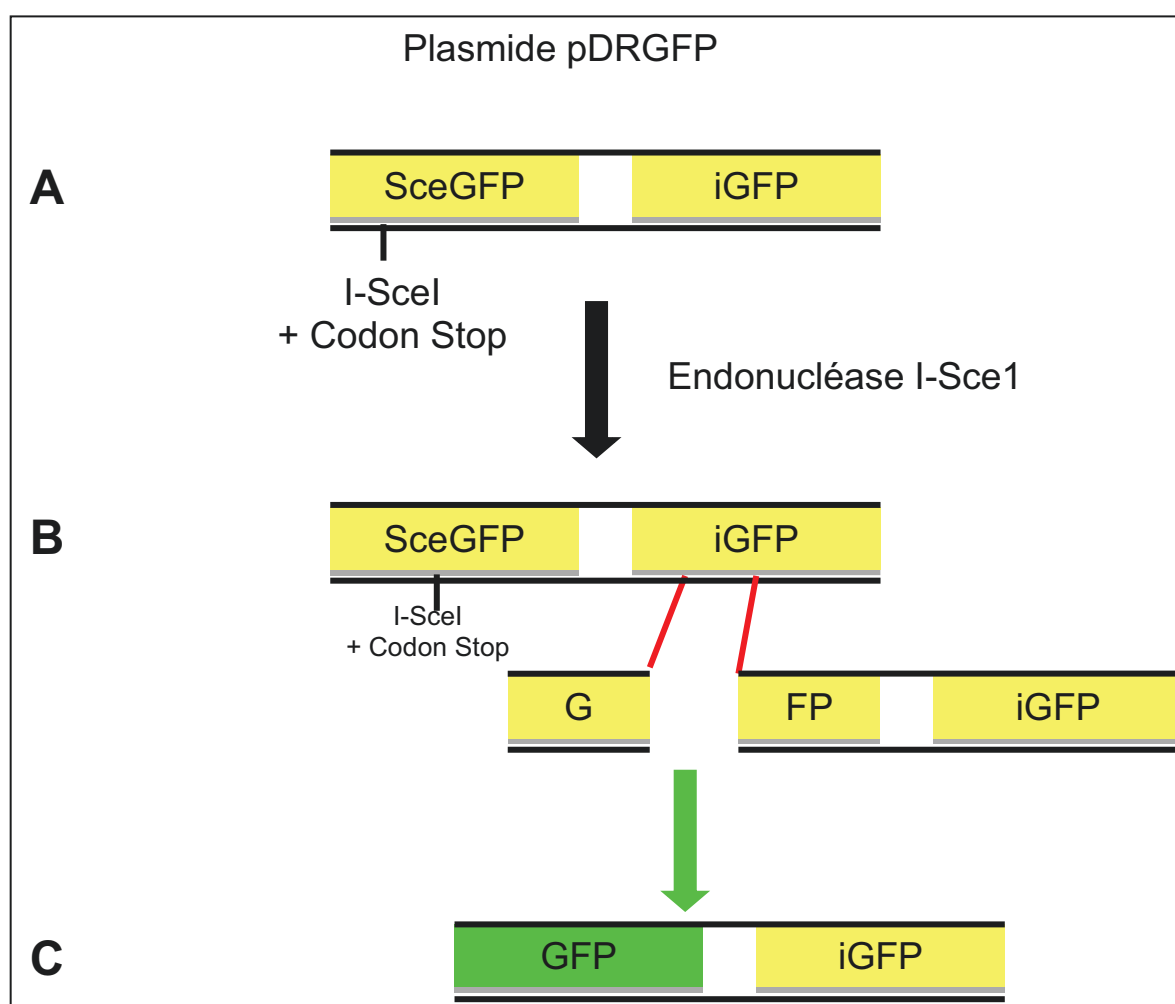


Figure 36. Schéma du plasmide pDRGFP. (A) Le plasmide pDRGFP est composé d'une séquence codante pour la protéine GFP avec un site de restriction pour l'enzyme I-SceI associé à un codon stop et une séquence GFP tronquée. La présence de l'enzyme de restriction I-SceI génère un clivage du site de restriction du plasmide menant à une CDB. (B) La séquence tronquée va servir de matrice pour une réparation de la CDB par Recombinaison Homologue. (C) La réparation de la CDB permet l'expression d'une protéine GFP fonctionnelle.

Le plasmide pim Δ EJ5 (Figure 37) contient un promoteur séparé de la séquence GFP par un gène de résistance, lui-même entouré de deux sites de restriction I-SceI. En présence de cette enzyme, le clivage des sites de restriction va permettre l'élimination du gène de résistance et l'apparition d'une CDB entourée par la séquence du site d'I-SceI. La réparation par la NHEJ pourra alors s'effectuer en rapprochant les brins d'ADN qui présentent des séquences similaires. Cependant, la NHEJ n'étant pas fiable, des erreurs pourront survenir sur l'ADN. Cela n'impactera pas la séquence GFP mais empêchera la reconstitution d'un nouveau site I-SceI. Toutefois, si le cas se présente, il y aura de nouveau clivage puis les cellules auront de nouveau la chance de réparer la CDB par NHEJ et donc rapprocher le promoteur de la séquence GFP pour alors exprimer la protéine GFP.

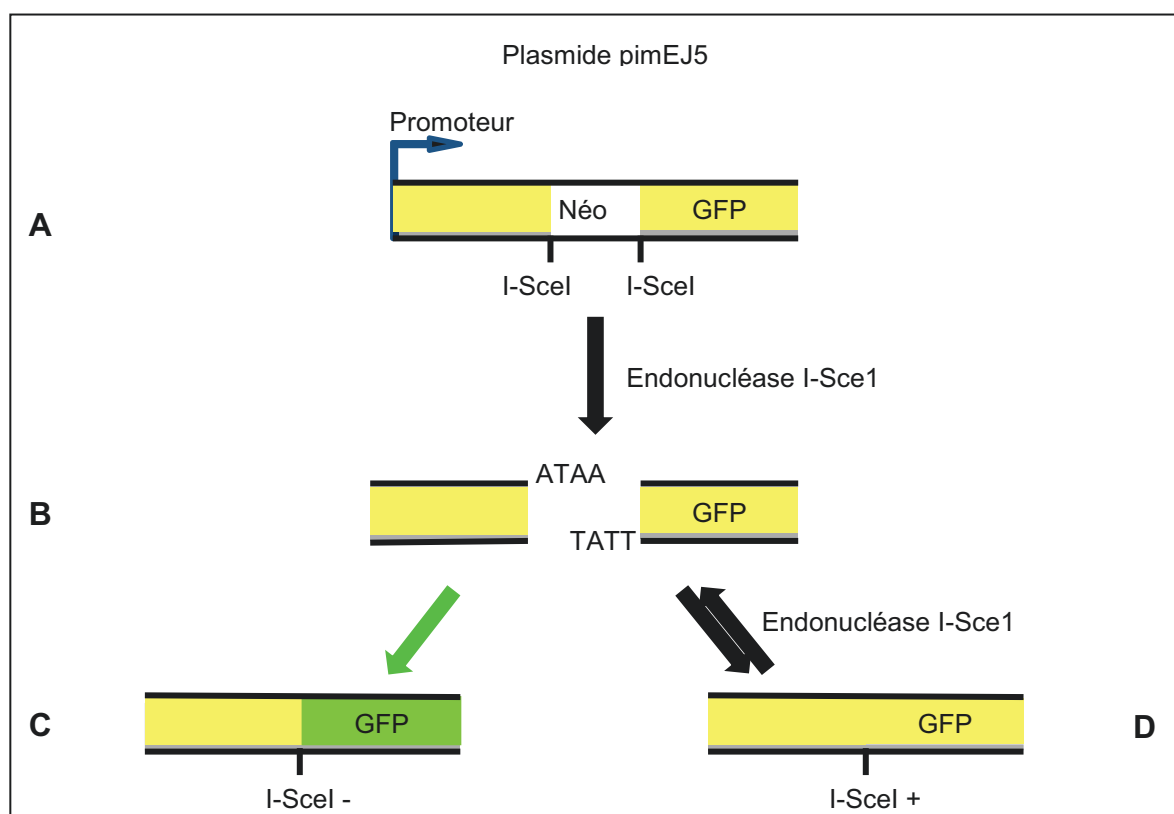


Figure 37. Schéma du plasmide pim Δ EJ5. (A) Le plasmide pim Δ EJ5 est composé d'un promoteur espacé d'une séquence codante pour la protéine GFP par un gène de résistance. Celui-ci est lui-même entouré de deux sites de restriction I-SceI. La présence de l'enzyme de restriction I-SceI génère des clivages des sites de restriction menant à une CDB. (B) Le gène de résistance sera alors enlevé et la CDB correspondra aux extrémités des sites de restriction. (C) La réparation par la NHEJ, pouvant générer des erreurs va alors permettre la réparation de la CDB mais sans la présence d'un site I-SceI. (D) Si la réparation se fait sans erreur, un nouveau site de restriction se reformera et sera de nouveau la cible de l'enzyme I-SceI.

Nous avons cherché à générer des clones stables de cellules U2OS transfectées par les plasmides pDRGFP ou pimΔEJ5 mais face à notre incapacité de générer ces clones par dilution limite, nous avons alors utilisé les plasmides pDRGFP et pimΔEJ5 dans des cellules HEK293.

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides pDRGFP et pimΔEJ5 pour générer des lignées cellulaires stables HEK293 pDRGFP et HEK293 pimΔEJ5. Ces lignées cellulaires ont été infectées avec les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 préalablement modifiés pour enlever le gène codant pour la GFP. Comme dans nos lignées cellulaires U2OS, les shARN déstabilisent le complexe MCM dans ces lignées cellulaires HEK293 (Figures 38A-B). Le plasmide IsceI a alors été transfecté pendant 96 heures induisant ainsi des CDB au sein de nos lignées cellulaires HEK293. Les cellules ont par la suite été resuspendues dans du PBS 1X puis analysées au cytomètre en flux. 100,000 cellules ont été comptées au cytomètre et les protéines exprimant la protéine GFP ont été discriminées. L'expression d'IsceI semble entraîner une augmentation du nombre de cellules exprimant la protéine GFP passant de 0.056% à 0.189% dans nos lignées contrôles après transfection du plasmide IsceI. Ces cellules ont donc eu la capacité de réparer les CDB par HR. Dans nos cellules HEK293 shMCM2 et HEK293 shMCM3, le pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP passe de 0.07% à 0.088% et de 0.7% à 0.104% respectivement (Figure 38C). Ainsi, dans notre lignée contrôle il y a une augmentation de près de trois fois du nombre de cellules pouvant réparer les CDB par HR contrairement à nos deux autres lignées cellulaires (Figure 38E). La déstabilisation du complexe MCM ne semble donc pas augmenter le nombre de cellules exprimant la protéine GFP.

Pour étudier le mécanisme de réparation par NHEJ, nos lignées cellulaires stables HEK293 pimΔEJ5 ont été transfectées avec le plasmide IsceI. Dans notre lignée cellulaire contrôle, le pourcentage de cellules présentant une capacité de réparation par l'intermédiaire de la NHEJ passe de 0.413% à 5.694% après une transfection avec IsceI. Ces pourcentages passent de 0.433% à 3.803% et de 0.433% à 3.974% pour les cellules HEK293 pimΔEJ5 shMCM2 ou shMCM3 (Figure 38D). Les cellules exprimant la protéine GFP ont augmenté de près de 8 fois pour chacune de nos lignées cellulaires sans présenter

de différences significatives (Figure 38F). Ces résultats suggèrent donc une implication du complexe MCM dans la HR mais pas dans le mécanisme de réparation par NHEJ.

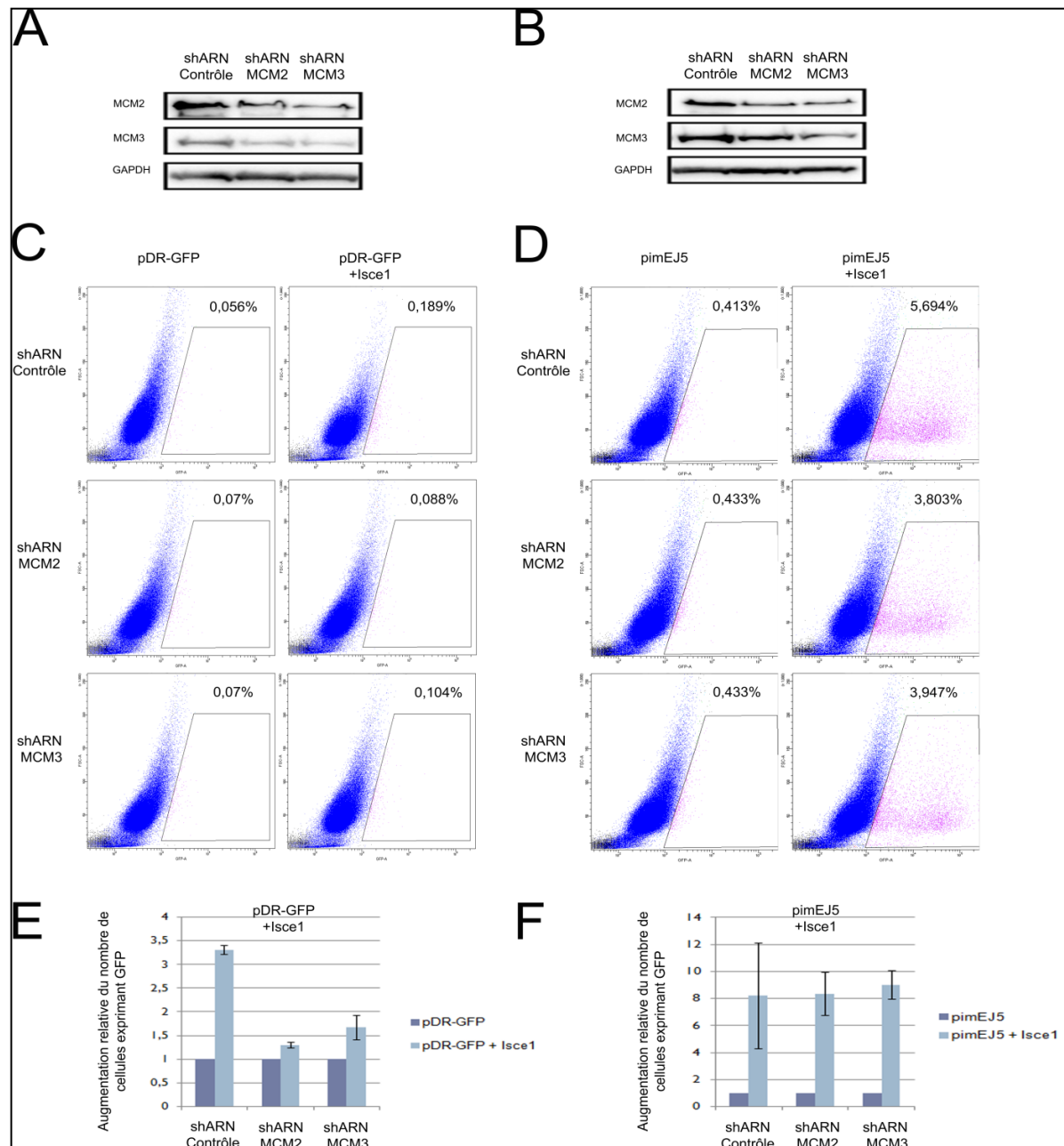


Figure 38. Effets d'une diminution du complexe MCM sur les mécanismes de réparation des cassures double brin. Des cellules HEK293 transfectées avec le plasmide pDRGFP (A) et pimΔEJ5 (B) ont été infectées avec les shARN contrôle, MCM2 ou MCM3 et ces protéines ont été analysées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-MCM2, anti-MCM3 et anti-GAPDH. Les lignées cellulaires infectées HEK293 pDRGFP (C) et HEK293 pimΔEJ5 (D) ont été resuspendues dans du PBS 1X et analysées par cytométrie en flux pour identifier la quantité de cellules exprimant la protéine GFP sur un total de 100,000 cellules. Ratios du pourcentage de nos lignées cellulaires infectées HEK293 pDRGFP (E) ou HEK293 pimΔEJ5 (F) identifiées comme positives à la GFP après transfection avec le plasmide Isce1 sur les cellules non transfectées.

4.2.6 Effet d'une diminution du niveau d'expression des protéines MCM sur le phospho-protéome en réponse à l'étoposide

Nos résultats précédents ont montré qu'une diminution du complexe MCM semblait entraîner une diminution du niveau de phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la DDR. Nous avons alors cherché à déterminer si cette diminution pouvait avoir un impact sur le niveau de phosphorylation d'autres protéines cellulaires. Pour cela, nous avons voulu identifier et quantifier les protéines phosphorylées en réponse à l'étoposide ainsi que les modifications de celles-ci lors d'une diminution du complexe MCM. Nous avons utilisé l'approche triple SILAC. La lignée cellulaire U2OS shContrôle a été cultivée en milieu SILAC léger (R0K0) et non traitée ou en milieu SILAC moyen (R6K4) et traitée 1 heure avec 10 μ M d'étoposide. Le ratio M/L a permis d'identifier et de quantifier les changements de phosphorylation en réponse à l'étoposide. Dans le milieu SILAC lourd (R10K8), les cellules U2OS infectées par les shARN contre MCM2 ou MCM3 ont été cultivées puis traitées 1 heure avec 10 μ M d'étoposide. Le ratio H/M, quant à lui, a permis d'identifier et de quantifier les changements de phosphorylation lors d'une diminution des protéines MCM en réponse à l'étoposide (Figure 39A). Par la suite, un fractionnement a été réalisé afin d'enrichir les protéines nucléaires, principalement, dans chacune des conditions (Figure 39B). Les protéines ont été mélangées, digérées à la trypsine et les peptides obtenus ont été purifiés sur des billes d'oxyde de titane (TiO₂) et analysés par spectrométrie de masse (Figure 39B). 338 peptides phosphorylés ont été identifiés, représentant 274 protéines, dont leur phosphorylation diminue de près 2 fois ou plus dans nos lignées U2OS shMCM2 ou shMCM3 en réponse à l'étoposide. Au contraire, 347 peptides, représentant 262 protéines, voient leur phosphorylation augmentée de 2 fois ou plus.

Parmi les protéines présentant une diminution de phosphorylation, 65 d'entre elles vont pouvoir être classées en 8 voies de signalisation dont la réplication de l'ADN, le remodelage de la chromatine ou la réparation de l'ADN (p -values < 0,01) (Figure 39C). En regardant les protéines impliquées, nous retrouvons une diminution des protéines MCM2

et MCM3 mais surtout des protéines connues pour être impliquées dans le remodelage de la chromatine comme une protéine du complexe SWI/SNF ou encore des protéines modulant le niveau d'acétylation des histones comme les protéines HDAC1 et HDAC2. De façon intéressante, nous avons pu identifier par cette approche une diminution de phosphorylation de protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des CDB et plus particulièrement impliquées dans la HR. Il s'agit des protéines ATM, BRCA1 et Top53BP1 (Figure 39E).

Pour les protéines présentant une augmentation de phosphorylation, 106 d'entre elles ont pu être classées en 11 voies de signalisation (p-values < 0,01). De façon intéressante, nous avons également pu identifier des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ou la réparation de l'ADN (Figure 39D). En regardant les protéines impliquées, nous retrouvons une augmentation de phosphorylation des protéines CHD1, CHD2 et CHD7, qui appartiennent à la famille des CHD, impliquée dans le remodelage de la chromatine, ou d'autres protéines de la réparation des dommages à l'ADN telles que MUS81, UVRAG ou encore DDB2 (Figure 39F).

Ainsi, il apparaît qu'une diminution du complexe MCM entraînerait une diminution de phosphorylation des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et dans la réparation des CDB mais entraîneraient une augmentation de phosphorylation d'autres protéines impliquées dans ces mêmes processus cellulaires.

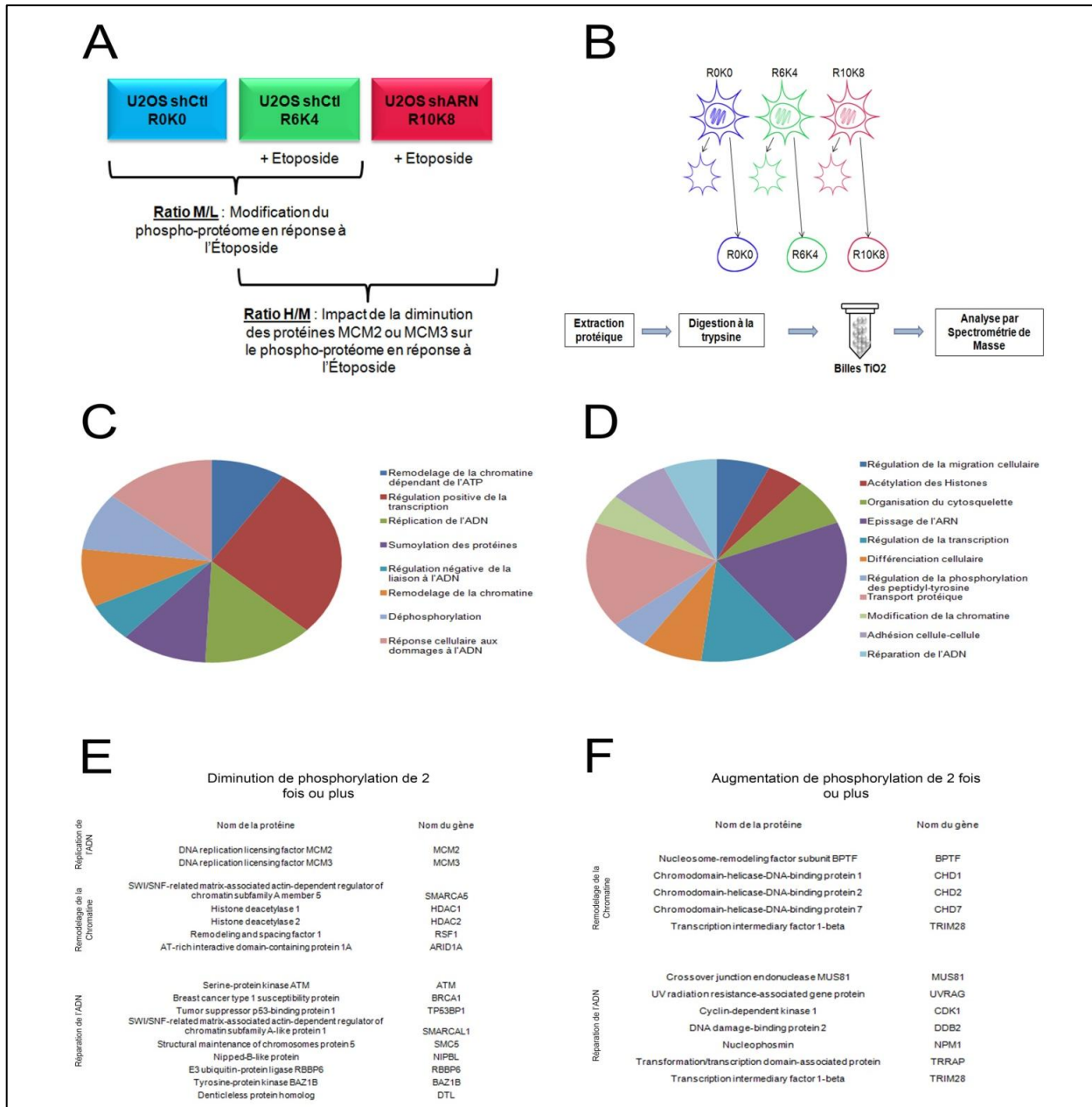


Figure 39. Effets d'une diminution du complexe MCM sur le phospho-protéome en réponse aux cassures double brin. (A-B) Des cellules U2OS infectées avec les shARN contre MCM2 ou MCM3 ont été cultivées dans différents milieux SILAC et traitées à l'étoposide, fractionnées puis digérées afin de purifier les phosphopeptides. (A) La lignée cellulaire U2OS shContrôle a été cultivée en milieu SILAC léger (R0K0) et non traitée ou en milieu SILAC moyen (R6K4) et traitée 1 heure avec 10 μ M d'étoposide. Les cellules U2OS infectées par les shARN contre MCM2 ou MCM3 ont été cultivées en milieu SILAC lourd (R10K8) puis traitées 1 heure avec 10 μ M d'étoposide. (B) Les cellules ont été fractionnées afin d'isoler les protéines nucléaires. Les protéines ont été extraites, digérées à la trypsine puis purifiées sur des billes d'oxyde de titane avant d'être analysées par spectrométrie de masse. (C-D) Les résultats obtenus par spectrométrie de masse sont analysés avec le logiciel David 2.0. Les voies de signalisation regroupant plus de quatre protéines et présentant une p-value < 0,01 pour une diminution de phosphorylation ou une p-value < 0,1 pour une augmentation de phosphorylation sont représentées sous forme de diagramme circulaire. (E-F) Listes des protéines identifiées et connues pour jouer un rôle dans les mécanismes de remodelage de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN ou impliquées dans des mécanismes de réparation de l'ADN.

5. Discussion

5.1 La protéomique quantitative révèle des changements d'interaction du complexe MCM en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide

5.1.1 Changement de localisation du complexe MCM en réponse aux CDB

Afin de mieux comprendre la réponse cellulaire aux CDB de l'ADN et plus particulièrement celle induite par l'étoposide, nous avons cherché à identifier une dynamique de localisation des protéines en réponse à cet agent. En effet, la localisation des protéines dans la cellule est très souvent corrélée à leurs fonctions et plusieurs approches s'offrent à nous. De nombreuses études se sont concentrées sur la détermination de la composition protéique d'un ou plusieurs compartiments subcellulaires (Andersen et al. 2002; Andersen and Mann 2006) mais plus récemment, l'étude du changement de localisation des protéines en réponse à un stimulus a émergé (Boisvert et al. 2010). En se basant sur l'analyse par spectrométrie de masse, permettant une identification et une quantification des protéines, une nouvelle approche a été développée : la protéomique spatiale. Cette méthode se base sur la culture de cellules en milieu SILAC associée à un fractionnement cellulaire. Les différents compartiments cellulaires issus des différents milieux SILAC, traités ou non à l'étoposide, sont regroupés pour reformer une cellule entière dans laquelle chaque compartiment cellulaire arborera une signature isotopique propre. L'implantation du même nombre de cellules pour chaque condition ainsi que l'harmonisation de tous les volumes durant les expériences nous assurerons le maintien des proportions protéiques in situ. Cette approche nous a permis d'identifier les changements de localisation au sein du protéome.

Seul un petit nombre de protéines montre un changement de localisation (moins de 5%). Parmi les protéines identifiées, certaines d'entre elles sont déjà connues pour jouer un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN et plus particulièrement dans la NER et la NHEJ comme les protéines XPC (Sugasawa et al. 1998; Masutani et al. 1994; Nishi et

al. 2005) ou Ku70/Ku80 (Mimori, Hardin, and Steitz 1986; Jeggo et al. 1999) respectivement. Cela confirme ainsi que notre approche permet une identification des protéines impliquées dans ces processus. Cependant, il est assez surprenant de pouvoir identifier des protéines de la NER car l'étoposide est plus particulièrement utilisé pour générer des CDB (Montecucco and Biamonti 2007), dommages réparés par la NHEJ ou la HR. Cela pourrait constituer une nouvelle découverte sur le rôle de la NER dans la réparation des CDB induites par l'étoposide bien qu'il ait été suggéré que des mécanismes non spécifiques des CDB, comme la NER et la MMR (Ye Zhang, Rohde, and Wu 2009), pouvaient être impliqués dans la réponse aux RI. Nos résultats ont permis de quantifier des changements dans la localisation subcellulaire des protéines en réponse à un traitement à l'étoposide et d'identifier des protéines impliquées dans la DDR. La spécificité des effets observés est soulignée par le fait que la plupart du protéome n'est pas affectée par un traitement à l'étoposide. De plus, l'identification concomitante des protéines ayant une redistribution similaire fournit des indices sur les potentielles interactions protéiques ou sur les mécanismes fonctionnels communs dans lesquels ces protéines pourraient être impliquées. Nous avons trouvé des protéines connues pour jouer un rôle dans la réplication de l'ADN et qui sont regroupées selon un profil similaire de redistribution avec des protéines impliquées dans les mécanismes de la NER et la NHEJ. Ces résultats suggèrent un lien entre la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN. Parmi les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, six d'entre elles, formant le complexe MCM, ont été identifiées. Pour mieux caractériser l'implication de ces protéines MCM dans la DDR, nous avons voulu identifier les partenaires d'interaction du complexe MCM, et plus particulièrement en réponse à l'étoposide.

5.1.2 Identification des partenaires d'interaction du complexe MCM par spectrométrie de masse

Au vu des résultats sur les changements de localisation en réponse à l'étoposide, il nous a alors paru intéressant de caractériser le rôle des protéines MCM dans la DDR. Pour cela, nous avons voulu identifier les partenaires d'interaction des sous-unités du complexe MCM. Nous avons utilisé des lignées cellulaires U2OS FT stables pour exprimer, sous induction, les protéines GFP-MCM. Les deux premiers plasmides générés au laboratoire ont permis l'étude des partenaires d'interaction des sous-unités MCM2 et MCM5.

5.1.2.1 Identification des partenaires d'interaction des protéines recombinantes GFP-MCM2 et GFP-MCM5

Les études d'interaction des protéines MCM2 et MCM5 ont permis l'identification de protéines déjà connues pour interagir avec les protéines MCM ainsi que de nouvelles interactions. La protéine GFP-MCM5 a été exprimée à des niveaux proches du niveau endogène et a montré, comme attendu, une distribution principalement nucléaire. Cependant, elle n'a pas été totalement incorporée dans un complexe MCM fonctionnel, contrairement à la protéine GFP-MCM2. Son seul partenaire identifié est MCM3, protéine qui permet de former le dimère MCM3/MCM5 (M. L. Bochman, Bell, and Schwacha 2008; Davey, Indiani, and O'Donnell 2003) et d'expliquer la localisation nucléaire de MCM5 car seules les protéines MCM2 et MCM3 présentent une séquence NLS (signal de localisation nucléaire) (Kimura et al. 1996; Liku et al. 2005). Le niveau d'expression de la protéine MCM2, quant à lui, est régulé à la baisse en présence de la protéine MCM2 exogène suggérant un mécanisme de contrôle du niveau d'expression des protéines que nous discuterons plus loin.

Une autre observation intéressante est l'identification de la protéine MCMBP (MCM binding protein) comme interagissant avec la protéine MCM2. Bien qu'il ait été initialement proposé que MCMBP puisse remplacer MCM2, entraînant la formation d'un complexe différent avec les protéines MCM3 à MCM7 (Sakwe et al. 2007), il a également été montré que MCMBP pouvait interagir avec toutes les protéines du complexe MCM, y

compris la protéine MCM2, et suggéré que cette protéine pouvait avoir un rôle à jouer dans la régulation de la réplication de l'ADN (Nguyen et al. 2012). Nos résultats montrent clairement que MCM2 et MCMBP peuvent être présents dans le même complexe puisque MCMBP était présent lorsque la protéine GFP-MCM2 a été immunoprécipitée. Cela semble appuyer, dans des cellules humaines, les travaux de Nguyen et collaborateurs sur la présence de MCMBP et du complexe MCM.

Comme seule l'expression de la protéine recombinante GFP-MCM2 permet la formation d'un complexe MCM, contrairement à GFP-MCM5, nous nous sommes alors intéressés à la dynamique d'interaction de la protéine MCM2 en réponse à des CDB générées par l'étoposide.

5.1.2.2 Changements des interactions de la protéine MCM2 en réponse à l'étoposide

L'utilisation de la spectrométrie de masse assure une identification et une quantification relative des protéines nous permettant d'en déduire tout changement d'interaction avec une protéine immunoprécipitée. Nous avons utilisé une approche SILAC couplée à une IP qui nous a permis d'identifier et de quantifier les protéines co-immunoprécipitées par spectrométrie de masse. Nous avons pu identifier quatre protéines présentant des interactions modulées avec le complexe MCM en réponse à un traitement induisant des CDB. Trois de ces protéines montrent une augmentation de leur enrichissement, ASF1A, Paladin (PALD1) et Importin-7, et une protéine montre une diminution d'interaction, CHD3.

Cette dernière est une protéine impliquée dans plusieurs fonctions différentes au cours de la modulation de la structure de la chromatine. Cette baisse d'interaction pourrait donc être associée à son relâchement pour faciliter la réparation des CDB. En effet, c'est un composant du complexe NuRD, un complexe de désacétylation des histones qui participe à la compaction de la chromatine. De plus, il a été montré que CHD3 pouvait être impliquée dans le remodelage du nucléosome durant la réponse aux CDB de l'ADN. Il a également été montré qu'une déplétion de CHD3 entraînait une phosphorylation plus

importante d'H2AX et une augmentation de la sensibilité des points de contrôle du cycle cellulaire, démontrant ainsi un rôle de la compaction de la chromatine dans la propagation du signal de dommages à l'ADN. De façon intéressante, il a également été démontré que CHD3 était recrutée aux sites de dommages à l'ADN. Elle est par la suite relâchée de la structure chromatinienne (Goodarzi, Kurka, and Jeggo 2011).

Parmi les protéines présentant une augmentation d'interaction avec MCM2, Paladin est une protéine non caractérisée avec un domaine phosphatase STY mais qui ne présente pas de fonction connue au sein de la réponse aux dommages à l'ADN. Considérant que le complexe MCM est phosphorylé sur de multiples sites, il serait probable que ces protéines puissent être des substrats de Paladin. Cependant, notre analyse par spectrométrie de masse ne nous a pas permis d'identifier d'augmentation dans la phosphorylation des protéines MCM sur leurs sites de phosphorylation connus pour être impliqués dans l'activation de la fourche de réplication (Sheu and Stillman 2006; Tsuji, Ficarro, and Jiang 2006), suggérant ainsi que les changements observés dans les interactions protéiques sont induits en réponse à l'étoposide. De plus, les différents temps de traitement réalisés sont généralement trop courts pour impacter de façon significative sur le cycle cellulaire ou pour permettre une activation précoce de la réplication. D'autre part, la phosphorylation des protéines MCM sur des sites consensus généralement considérés comme des marqueurs protéiques de la DDR a été augmentée telle que sur le site consensus SQ, site connu pour être phosphorylé par ATM/ATR (Traven and Heierhorst 2005a). Plus particulièrement, nous retrouvons une augmentation de phosphorylation de la Sérine 108 de MCM2, connue pour être phosphorylée par ATR en réponse à un stress réplcatif et par ATM en réponse à des RI (David Cortez, Glick, and Elledge 2004). Il apparaît donc que ce site de phosphorylation présente également un intérêt au cours de la réponse aux CDB. Cela semble suggérer un mécanisme de régulation du complexe MCM dans la DDR. Par ailleurs, MCM2 interagit plus fortement avec une seconde protéine, qui elle aussi peut interagir avec ATM : la protéine ASF1A.

5.1.3 Augmentation de l'interaction entre les protéines MCM2 et ASF1A en réponse aux CDB

MCM2 et ASF1A présentent une augmentation dans leur interaction en réponse aux CDB. Cette chaperonne d'histones qui facilite leur importation au noyau et leur dépôt au cours de la réplication, est également connue pour jouer un rôle au cours de la réparation de l'ADN (Canfield, Rains, and De Benedetti 2009). Par ailleurs, les protéines MCM2, ASF1A et les histones H3 et H4 forment un complexe au cours de la réplication de l'ADN et il est intéressant de constater que ce complexe semble également se former en réponse à des CDB.

Ces résultats ont été obtenus par spectrométrie de masse et il est nécessaire de les confirmer par immunobuvardage et/ou IF en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre ces protéines. Nous avons donc pu confirmer ces interactions par immunobuvardage où nous avons pu comparer deux types d'extraction protéique. La première, au tampon triton, nous permet de voir moins d'histones que la seconde, au tampon RIPA. Cette seconde extraction semble nécessaire pour permettre une meilleure solubilisation des protéines de la chromatine. Cette difficulté d'extraction est probablement due à une interaction MCM2-ASF1A à la chromatine, rendant ainsi plus difficile la solubilisation de ces protéines. En réponse à des CDB, nous avons pu confirmer une augmentation d'interaction entre MCM2 et ASF1A au niveau de la chromatine démontrant ainsi que cette interaction est modulée en réponse aux dommages à l'ADN.

Il semblerait donc que la réponse cellulaire aux CDB inclurait des changements d'interaction du complexe MCM avec notamment la formation de complexes MCM-ASF1A additionnels pouvant se situer à la chromatine (discuté après).

5.1.4 Colocalisation des protéines MCM2, ASF1A et γ H2AX

Suite à cette interaction entre MCM2 et ASF1A en réponse aux dommages à l'ADN, nous avons voulu vérifier si les protéines MCM2 et ASF1A pouvaient être associées à des sites de CDB. Nous avons cherché à évaluer la localisation de MCM2 et ASF1A dans les cellules avant et après traitement à l'étoposide. La concentration d'étoposide a été

diminuée à 1 μM pour nous permettre de distinguer les foyers nucléaires de γH2AX (phénomène non observé à des concentrations d'étoposide plus élevées comme 10 μM). Nous avons trouvé une colocalisation partielle de MCM2 et γH2AX dans certains foyers présents au sein des cellules. ASF1A a, quant à elle, une colocalisation plus importante avec γH2AX suite au traitement à l'étoposide. Comme toutes les cellules ont montré une colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A avec la protéine γH2AX , nous avons évalué le pourcentage de cellules présentant trois foyers de colocalisation. Dans les deux cas, nous avons trouvé une augmentation significative de la colocalisation des protéines MCM2 et ASF1A avec γH2AX , ce qui confirmerait la présence de ces protéines sur les sites de dommages à l'ADN. Cependant, la colocalisation de MCM2 et γH2AX peut être sujette à débat étant donné que même si la colocalisation semble augmenter, seulement trois points montrant cette colocalisation ont été dénombrés.

La formation d'un foyer nucléaire de γH2AX correspond à plusieurs dizaines de protéines H2AX phosphorylées (Paull et al. 2000; Stucki et al. 2005). D'autre part, la protéine MCM2 n'est peut-être pas présente aux sites de dommages en si grand nombre. La stabilité du complexe MCM (dont nous discuterons plus loin) laisse penser que les protéines MCM doivent être assemblées en complexe pour être stables. L'encombrement stérique qui en découle pourrait empêcher un recrutement massif de protéines MCM2 (et donc de complexe MCM) aux sites de CDB. De plus, si le complexe MCM présente également une fonction d'hélicase de l'ADN dans de telles circonstances (fonction non élucidée ici), un seul complexe MCM est nécessaire à l'ouverture de la double hélice d'ADN. Dans la continuité de cette idée de fonction d'hélicase, l'ouverture de l'ADN par le complexe MCM pourrait justifier son exclusion des sites de CDB. La protéine ASF1A serait peut-être nécessaire en grand nombre aux sites de CDB pour faciliter la formation des nucléosomes suite à la réparation de l'ADN comme il l'a été suggéré *in vitro* (Mello et al. 2002; C.-C. Chen et al. 2008).

Ainsi, nos résultats ne nous ont pas permis de savoir si l'assemblage de ces complexes s'effectuerait spécifiquement aux foyers nucléaires. Deux hypothèses semblent se dessiner. Premièrement, MCM2 serait présente en faible quantité aux sites de CDB

comparativement à ASF1A ce qui expliquerait ce faible taux de colocalisation entre MCM2 et γ H2AX. Deuxièmement, en réponse à l'étoposide, il y a une augmentation d'interaction entre MCM2 et ASF1A au niveau de la chromatine, mais une augmentation qui ne se ferait pas nécessairement aux sites de CDB. Il serait alors intéressant de pouvoir utiliser un troisième anticorps d'une espèce différente des deux premières ainsi qu'un anticorps secondaire spécifique à cette espèce comme par exemple un anticorps primaire de rat suivi d'un anticorps anti-rat Alexa 633 de longueur d'onde différente pour pouvoir colocaliser les trois protéines en même temps afin de déterminer la localisation du complexe MCM2-ASF1A- γ H2AX. Une approche par BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) permettrait également d'étudier la proximité entre γ H2AX et MCM2 et ce, même si la quantité de protéine MCM2 aux sites de CDB est très faible.

Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre le rôle et la localisation de l'interaction des protéines MCM2 et ASF1A, sans pour autant nous renseigner si ce mécanisme est impliqué dans la réponse aux CDB. Une approche plus directe pour déterminer le rôle du complexe MCM dans la réponse aux CDB serait d'inhiber ce complexe et d'étudier l'impact que cela pourrait avoir sur la cellule.

5.2 La déstabilisation du complexe MCM module la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par l'étoposide

5.2.1 Effets d'une diminution des protéines MCM sur la cellule

Nos résultats précédents nous laissent supposer que le complexe MCM pourrait être impliqué dans la réponse aux CDB de l'ADN. Nous avons donc cherché à étudier l'impact d'une diminution des protéines MCM sur la réponse cellulaire aux CDB induites par l'étoposide. Pour commencer, nous avons généré des lignées cellulaires exprimant des shARN dirigés contre les protéines MCM2 ou MCM3. Les protéines MCM étant impliquées dans la réplication de l'ADN, des courbes de croissance ont été réalisées. Un défaut des protéines de réplication peut altérer la croissance cellulaire en ralentissant le cycle de la cellule (Machida, Teer, and Dutta 2005; Shreeram et al. 2002). Contrairement à ces faits,

nous n'avons pas constaté de ralentissement dans la croissance de nos lignées cellulaires. Cela renvoie au paradoxe des protéines MCM suggérant qu'une diminution de près de 90% de ces protéines n'impactait pas sur la croissance cellulaire comme l'ont également montré Ibarra et collaborateurs (Ibarra, Schwob, and Méndez 2008) suite à l'utilisation d'ARN interférents ciblant les protéines MCM2 et MCM3. Plusieurs autres études ont également pu confirmer ces observations.

Il avait également été suggéré qu'une diminution du chargement des protéines MCM sur les complexes pré-RC, élément clé de la fourche de réplication, pouvait entraîner un arrêt des cellules en phase G1/intra-S suite à une diminution du nombre de complexes de réplication de l'ADN (Shreeram et al. 2002; Wohlschlegel et al. 2002; Zhu and Depamphilis 2009; McGarry and Kirschner 1998). A la suite de nos expériences d'étude du cycle cellulaire, nous n'avons observé aucun changement entre nos lignées U2OS shMCM2 et shMCM3 comparativement à la lignée contrôle. La diminution de l'expression des protéines MCM2 et MCM3 induite par shARN n'entraîne donc pas d'altération de la croissance cellulaire ni du cycle cellulaire dans nos lignées. Ces informations nous laissent penser que, suite à nos traitements à l'étoposide sur ces lignées cellulaires, toutes les variations observées ne seraient pas imputables à un changement de la réplication ou à une altération de la fonction d'hélicase du complexe MCM.

Plusieurs études ont montré une déstabilisation du complexe MCM lors d'une diminution d'une seule des protéines de ce complexe (Yu et al. 2016). Nous avons donc cherché à vérifier ce fait dans nos lignées cellulaires. En effet, l'utilisation de nos shARN entraîne bien une diminution de l'ensemble des protéines du complexe MCM, diminution que nous assumons comme une conséquence de la déstabilisation du complexe MCM. Les études démontrent en effet que les protéines issues d'un complexe ont une plus grande stabilité au sein de leur complexe que lorsqu'elles sont isolées (Boisvert et al. 2012). De plus, le complexe MCM peut être subdivisé en deux sous-complexes : les complexes MCM 2/4/6/7 et MCM 3/5 (M. L. Bochman, Bell, and Schwacha 2008; Davey, Indiani, and O'Donnell 2003). Un autre fait connu est que seules les protéines MCM2 et MCM3 possèdent une séquence NLS (Kimura et al. 1996; Liku et al. 2005), permettant ainsi une

relocalisation au noyau des deux sous-complexes. L'absence de ces deux protéines pourrait alors expliquer la diminution des autres protéines du complexe suite à une mauvaise localisation entraînant leur dégradation prématurée. Cependant, lorsque nous induisons une diminution de MCM2, nous observons une diminution de MCM3 et MCM5, et inversement, lorsque nous induisons une diminution de MCM3, nous pouvons constater une diminution de MCM2 et MCM7. Cela nous laisse donc penser que la stabilité de l'ensemble des protéines MCM provient de l'assemblage du complexe au complet et pas uniquement des sous-complexes. En complément, il serait intéressant d'étudier les temps de demi-vie des protéines MCM. En effet, après la sélection de nos lignées cellulaires suite à l'infection par nos shARN, la déstabilisation du complexe n'est pas immédiate. Ce délai laisse supposer que les protéines déjà présentes au sein de la cellule suffiraient, pour un temps, à maintenir des complexes MCM complets et fonctionnels. Le complexe se déstabilise probablement suite à un épuisement du stock de protéines MCM. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, comme le Mg132 par exemple, permettrait de vérifier si l'inhibition de la dégradation protéique, et par extension des protéines MCM non complexées, pourrait entraîner un retour à la normale des complexes MCM. Nous attendons néanmoins la déstabilisation complète du complexe pour ensuite étudier l'impact d'une diminution du complexe sur la réponse cellulaire à l'étoposide. De plus, afin de s'assurer que les effets que nous pourrions observer ne sont pas dus à l'un ou l'autre de nos shARN, nous avons utilisé les deux pour nous permettre de confirmer les résultats obtenus suite à une déstabilisation du complexe.

5.2.2 Effets d'une diminution des protéines MCM dans la réponse cellulaire aux CDB

Suite aux résultats obtenus sur la colocalisation de MCM2 et γ H2AX, nous avons cherché à déterminer si cette déstabilisation du complexe MCM pouvait influencer la phosphorylation de H2AX en réponse à l'étoposide. Cet inhibiteur de la topoisomérase II génère des CDB et entraîne une phosphorylation de H2AX sur sa Sérine 139. Cette forme phosphorylée de H2AX est nommée γ H2AX et constitue un marqueur des CDB. Bien qu'au

cours des dernières années, plusieurs études ont mis en évidence une implication de γ H2AX dans de nombreux mécanismes autres que la signalisation des CDB (Lu et al. 2008), dans notre cas, en absence de traitement à l'étoposide, γ H2AX n'est pas observé tant par immunobuvardage que par IF. La phosphorylation de H2AX dépendrait principalement de l'effet de l'étoposide et donc de l'apparition de CDB dans la cellule. Après un traitement à 1 μ M d'étoposide, nous détectons peu de γ H2AX alors qu'à 10 μ M d'étoposide, H2AX est fortement phosphorylée. Lors de la déstabilisation du complexe MCM, nous pouvons constater que la phosphorylation de H2AX est bien plus faible en réponse à 10 μ M d'étoposide. Cela suggérerait-il une absence de CDB ou un défaut de signalisation des CDB ?

Alors que l'étoposide est connu pour stabiliser la Topoisomérase II sur l'ADN, empêchant ainsi une religation après la coupure, nécessaire au déenroulement de l'ADN, son mode d'action pour générer des CDB est encore en discussion. Alors qu'un tel mécanisme semble suffisant pour induire des CDB, il a été suggéré que ces dommages seraient imputables au choc de la fourche de réplication sur le complexe Topoisomérase II-ADN. Il a également été proposé que les CDB puissent être induites par les mécanismes de transcription et de réplication survenant à tout moment du cycle cellulaire. Nos résultats nous ont montré, par immunofluorescence, que la majeure partie de nos cellules présentait des foyers de γ H2AX. Combiné au fait que nos cellules U2OS shContrôle, shMCM2 et shMCM3 sont en grande partie en phase G1 (sans aucune différence de répartition du cycle cellulaire entre nos lignées cellulaires), nous pouvons donc en déduire que les dommages à l'ADN se font à tout moment du cycle cellulaire, aussi bien en G1 (phase durant laquelle il n'y a pas de réplication) que durant les autres phases. Cette diminution de phosphorylation ne semble donc pas imputable à une diminution du nombre de complexes MCM ou à une diminution du nombre de fourches de réplication impactant sur le complexe Topoisomérase II-ADN. En réalisant un gel d'électrophorèse à champ pulsé (Pulsed-field gel electrophoresis en anglais), nous pourrions quantifier de manière relative la présence de CDB. Nous pourrions ainsi vérifier que la diminution de

phosphorylation de H2AX n'est pas due à une plus faible présence de dommages à l'ADN mais bien à une altération de la voie de signalisation.

Une seconde hypothèse sur les échanges d'histones pourrait également être discutée. Existe-t-il un échange d'histones favorisant la formation de foyers nucléaires γ H2AX et dans lequel le complexe MCM serait impliqué ? Peu d'études relatent ces possibles échanges entre les variants d'histones H2A et H2AX en faveur de la formation des foyers nucléaires. De plus, si cela se produit, ceci pourrait s'expliquer par l'impact du complexe MCM dans la modulation de la chromatine que nous détaillerons plus loin.

Une dernière hypothèse suggérerait que la voie de signalisation des dommages à l'ADN par la protéine ATM serait altérée. Cette kinase est le facteur de phosphorylation principal de H2AX. Si nous bloquons son activation ou son recrutement aux sites de dommages, cela pourrait expliquer la baisse de γ H2AX. En effet, en bloquant ATM, il n'y aurait plus de propagation de la phosphorylation de proche en proche de H2AX.

Nous avons alors regardé le niveau de phosphorylation de CHK2 et avons pu constater qu'il y avait également une diminution de celle-ci. Il semblerait que la déstabilisation de la signalisation des dommages à l'ADN soit confirmée. Par ailleurs, après avoir traité nos cellules pendant 19 heures à l'étoposide, le niveau de phosphorylation est identique dans toutes nos lignées cellulaires quelle que soit la concentration en étoposide utilisée (1 ou 10 μ M). Cela supporterait ainsi le constat de Théard et collaborateurs montrant que CHK2 pourrait être phosphorylée de manière indépendante d'ATM après 24 heures de traitement (Théard et al. 2001). Cela pourrait expliquer la phosphorylation de CHK2 que nous observons mais nous ne pouvons pas discriminer si cette phosphorylation est due à un problème dans l'activation de la protéine ATM, et donc le maintien de sa fonction, ou à son recrutement aux sites de CDB. Il a par exemple été montré que la perte des protéines MCM2 ou MCM6 par shARN entraînait une déstabilisation des complexes MCM (cohérent avec nos résultats précédemment discutés) mais également une diminution de la protéine MDC1 aux foyers de γ H2AX (Yu et al. 2016). Si la protéine MDC1 est moins présente, cela pourrait expliquer l'absence de recrutement d'ATM et donc la diminution de phosphorylation de H2AX et de CHK2. De plus, l'interaction constatée entre

les protéines ATM et MCM2 pourrait appuyer ce point (H. Y. Yoo et al. 2004). La vérification de la phosphorylation d'ATM sur sa Sérine 1981 (Bakkenist and Kastan 2003), site connu pour être phosphorylé en réponse aux CDB, permettrait de déterminer s'il s'agit d'une absence d'activation d'ATM ou alors d'une absence de recrutement d'ATM activée aux sites de CDB. Pour CHK1, la diminution de phosphorylation pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction entre MCM3 et CHK1 est nécessaire pour sa phosphorylation sur sa Sérine 345 (Xiangzi Han et al. 2014). Une étude de la fluorescence des protéines aux foyers nucléaires pourrait permettre de dénombrer le nombre de sites de phosphorylation par cellule et leurs intensités. En effet, cette diminution de H2AX pourrait aussi être due à une reconnaissance identique des sites de CDB associée à une plus faible quantité de H2AX phosphorylée dans chacun de ces sites, ou bien à une moins bonne reconnaissance des sites de CDB menant un à nombre de foyers nucléaires réduit.

Nous nous sommes interrogés sur l'impact que cela pourrait avoir sur le mécanisme de réparation des CDB. La HR semble être particulièrement affectée car toutes les études montrant une baisse de recrutement de protéines aux foyers nucléaires ont identifié des protéines de la HR. Nous avons utilisé les plasmides pDRGFP et pimΔEJ5 pour étudier la HR et la NHEJ respectivement. Nous avons généré des lignées cellulaires stables HEK293 transfectées avec les plasmides pDRGFP ou pimΔEJ5 puis les avons infectées avec nos différents shARN. Dans le cas des HEK293, la déstabilisation du complexe MCM semble également avoir lieu. Suite à l'expression de l'enzyme de restriction IscI (mécanisme détaillé dans la partie résultat), il est alors apparu qu'une déstabilisation du complexe semblait altérer la réparation des CDB par la HR contrairement à la NHEJ.

Associée à l'impact sur le recrutement de la protéine MDC1 aux foyers nucléaires, une déstabilisation du complexe MCM entraînerait une diminution du recrutement des protéines BRCA1 (Cui et al. 2017) et TopBP1 (Xia et al. 2016) aux sites de CDB. Il semblerait donc que cette déstabilisation engendrerait une altération dans le recrutement et l'activation des protéines de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN, et plus particulièrement des protéines impliquées dans la HR. Cela suggérerait fortement une implication des protéines MCM dans la DDR.

5.2.3 Effets d'une diminution des protéines MCM sur la sensibilité cellulaire aux CDB

Bien qu'il semble que les protéines MCM puissent avoir un rôle à jouer dans la HR, il est intéressant de constater que nous n'observons pas de différence de répartition des cellules dans le cycle cellulaire. En effet, toutes nos lignées cellulaires présentent un arrêt en phase G2. L'étoposide est connu pour activer le point de contrôle CHK2 permettant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Alors que nous observons une diminution de phosphorylation de CHK2 après 1 heure de traitement (temps trop court pour impacter sur le cycle cellulaire), nous avons laissé au repos nos cellules pendant 19 heures. Il apparaît alors un arrêt des cellules infectées avec nos shContrôle, shMCM2 et shMCM3 en phase G2 sans différence entre ces lignées cellulaires. Il pourrait être intéressant de vérifier les niveaux de phosphorylation de la protéine CDC25C, protéine en aval de CHK2 et impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons alors décidé d'augmenter le temps de traitement, mais aucune différence n'a été observée, tant au niveau de la phosphorylation de CHK2 qu'au niveau du cycle cellulaire entre nos différentes lignées, présentant un arrêt en phase G2. Une étude du niveau de la phosphorylation de la sous-unité catalytique DNA-PKcs serait intéressante à mener afin de vérifier s'il y a une activation supplémentaire de la NHEJ lors d'un défaut des protéines MCM.

Plusieurs études ont montré qu'une diminution des protéines de la HR entraînait une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques. Il a été montré qu'un défaut des protéines BRCA1 et BRCA2, sensibilisait les cellules à l'étoposide (Treszezamsky et al. 2007) et à d'autres agents chimiothérapeutiques (Alsop et al. 2012; Tan et al. 2008) ou qu'une diminution de la protéine Rad51 sensibilisait les cellules à la Mitomycine C (Budke et al. 2012). Ces résultats font ainsi de la HR une cible thérapeutique de premier choix. C'est pourquoi il a été particulièrement intéressant de constater que dans nos lignées cellulaires, nous n'avons pas de changement de sensibilité à l'étoposide. Un traitement de 10 μ M d'étoposide étant trop fort, nous avons diminué la concentration à 1 μ M. Aucune différence dans la sensibilité n'a été observée ce qui était inattendu. Néanmoins, une autre étude a montré qu'un blocage de la protéine ATM dans des cellules

T n'affectait pas la sensibilité des cellules à l'étoposide contrairement aux cellules Jurkat (Korwek et al. 2012).

Par ailleurs, alors que la HR semble être le mécanisme principal au cours des phases S et G2 (Takata et al. 1998; Rothkamm et al. 2003), il a été montré que des cellules présentant des défauts dans la HR pouvaient réparer près de 85% des CDB par le mécanisme de la NHEJ (Beucher et al. 2009). Une étude de ces mécanismes a également pu mettre en évidence une faible activation de la HR au cours de la phase G2, semblable au niveau de la phase G1, suggérant ainsi un rôle principal de la NHEJ dans la réponse aux CDB. Cela pourrait être cohérent avec nos résultats et ainsi laisser penser que, même si nous altérons le mécanisme de la HR dans nos lignées cellulaires, la NHEJ pourrait prendre le relai (Karanam et al. 2012). Plusieurs études supportent le fait que la protéine H2AX est phosphorylée principalement par ATM et que DNA-PK ne possède qu'un rôle très secondaire contrairement à son action sur CHK2 (Kastan and Lim 2000; Bakkenist and Kastan 2003). Cela pourrait ainsi expliquer le défaut de phosphorylation de H2AX et la phosphorylation tardive de CHK2 suite à un traitement de plus longue durée (Théard et al. 2001).

Alors qu'il semble qu'une diminution des protéines MCM impacte sur la phosphorylation des protéines de signalisation des CDB et sur le mécanisme de la HR en réponse à l'étoposide, cela n'est pas suffisant pour engendrer une modification de la sensibilité des cellules à l'étoposide.

5.2.4 Effets d'une diminution du complexe MCM sur le phospho-protéome en réponse aux CDB

Suite à l'ensemble des modifications de phosphorylation obtenu lors d'une diminution des protéines MCM en réponse à l'étoposide et à une absence de modifications de la sensibilité des cellules, nous avons voulu étudier le phospho-protéome par spectrométrie de masse dans les mêmes conditions. L'approche SILAC nous paraissait être la meilleure approche pour permettre une identification et une quantification relative des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles.

Une première approche de l'ensemble du protéome ne nous a pas permis d'identifier de protéines de la DDR ni de protéines nucléaires, les principales protéines identifiées étant des protéines cytoplasmiques. Considérant que les protéines impliquées dans la réponse cellulaire à l'étoposide se situent principalement dans le noyau, nous avons enrichi la fraction nucléaire, éliminant ainsi les protéines cytoplasmiques. Suite à l'extraction protéique, les protéines ont été digérées à la trypsine puis les peptides ont été purifiés sur billes d'oxyde de titane (TiO_2) avant d'être analysés par spectrométrie de masse. Cette approche nous a ainsi permis d'analyser seulement les peptides phosphorylés, augmentant ainsi les capacités d'identification.

Nous avons pu catégoriser les protéines présentant un changement de phosphorylation et deux catégories apparaissent comme particulièrement intéressantes : les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et celles impliquées dans le remodelage de la chromatine.

Nous pouvons dans un premier temps identifier une diminution des protéines phosphorylées MCM2 et MCM3, diminution normale suite à la diminution des protéines MCM par les shARN. De manière intéressante, la diminution des protéines MCM semble provoquer une baisse de phosphorylation de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme la protéine SMARCA5. Cette ATPase de la famille ISWI, faisant partie du complexe SNF2H/SMARCA5, est impliquée dans le remodelage de la chromatine et recrutée aux sites de dommages pour faciliter la réparation de l'ADN par la HR (Vidi et al. 2014). Nous avons également identifié une diminution de la phosphorylation de la protéine RSF1, connue pour être impliquée dans la HR (Min et al. 2014) et interagissant également avec SNF2H (Vidi et al. 2014). Pour finir avec les protéines du remodelage de la chromatine, nous avons pu identifier les protéines HDAC1 et HDAC2, des histones désacétylases dont le rôle principal est la compaction de l'ADN. Alors que des études suggèrent un rôle de ces protéines dans la NHEJ (Miller et al. 2010), il apparaît néanmoins que ces protéines pourraient avoir un rôle moindre dans la HR. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC entraîne une diminution de RAD51, bloquant ainsi la HR (Adimoolam et al. 2007). D'autres protéines présentent une diminution de

phosphorylation et sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. De façon intéressante, nous avons pu identifier les protéines ATM, BRCA1 et Top53BP1. Ces protéines, connues pour leur rôle dans la réparation de l'ADN et plus particulièrement la HR, semblent particulièrement intéressantes et en lien avec nos précédents résultats. D'autres protéines, impliquées dans la HR principalement, présentent également une diminution de niveau de leur phosphorylation comme les protéines BAZ1B (Cook et al. 2009), SMC5 (Potts, Porteus, and Yu 2006) et SMARCA1. Cette dernière, membre de la famille des SWI/SNF, semble avoir un rôle à jouer dans la NHEJ (Keka et al. 2015). Cependant, de par son interaction avec la protéine RPA aux sites de CDB et la nécessité de son élimination pour permettre le recrutement des protéines Rad51 sur les brins d'ADN (Postow et al. 2009), cette protéine pourrait potentiellement jouer un rôle dans la HR mais ce rôle dans l'un ou les deux mécanismes de réparation n'est pas discuté. A l'exception de cette dernière protéine, les protéines présentant une diminution de phosphorylation sont des protéines principalement impliquées dans le remodelage de la chromatine et dans le mécanisme de la HR.

En parallèle, une augmentation de la phosphorylation en réponse à l'étoposide est observée sur des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Parmi ces protéines, nous pouvons retrouver les protéines CHD, connues pour être impliquées dans la réparation des CDB de par leur rôle dans le remodelage de la chromatine. Il a en effet été montré que CHD2 interagissait avec PARP1 en faveur de la NHEJ (Luijsterburg et al. 2016). D'autres protéines sont également impliquées dans la NHEJ comme la protéine UVRAG (Zhao et al. 2012), TRRAP (Robert et al. 2006) ou BCLAF (Y. Y. Lee et al. 2012). D'autres mécanismes de réparation sont également représentés avec notamment CHD1 (Shenoy et al. 2017; Kari et al. 2016) ou MUS81 (Boddy et al. 2001) impliquées dans la HR, DDB2 (Ray et al. 2013) dans la NER ou encore la protéine CDK1 (Hentges et al. 2014) qui bloque la NHEJ.

De par ces résultats, alors qu'il apparaît une diminution de phosphorylation des protéines de la réparation des CDB et plus particulièrement de la HR, aucun mécanisme de réparation ne semble majoritairement représenté parmi les protéines présentant une

augmentation de phosphorylation. Néanmoins, les protéines UVRAG, CHD2 et BCLAF1 semblent intéressantes de par leur implication dans la NHEJ et des mécanismes de compensation pouvant avoir lieu entre les principaux mécanismes de CDB (J. A. Neal et al. 2011; Shenoy et al. 2017).

Les sites de phosphorylation identifiés, pour les protéines impliquées dans la HR, ne sont pas des sites connus et les étudier permettrait de découvrir des rôles potentiels à jouer dans la fonction des protéines. Cette approche par protéomique nous a permis d'identifier plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux CDB à différents niveaux. Néanmoins, il serait prématuré de conclure sur un rôle prédominant de l'un ou l'autre des mécanismes de réparation en réponse aux CDB induites par l'étoposide en absence de complexe MCM bien que la diminution de la HR semble induite et confirmerait nos résultats précédents. Ces résultats nous offrent de nouvelles voies à explorer, tant au niveau des protéines qu'au niveau de leurs modifications post-traductionnelles.

6. Conclusion et perspectives

L'étude du dynamisme protéique en réponse à des CDB induites par l'étoposide a permis de mettre en évidence un changement de localisation des protéines impliquées dans la réparation des dommages. Associées à ces protéines, nous avons pu identifier des protéines de la réplication de l'ADN, dont plus particulièrement les protéines MCM. Nous avons alors cherché à caractériser le rôle des protéines MCM dans la réponse cellulaire aux dommages induits par l'étoposide. Une approche de purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse a permis non seulement d'identifier les partenaires d'interaction du complexe MCM, mais également de mesurer des différences d'interaction en réponse aux dommages à l'ADN, et ce à différents temps de traitement à l'étoposide. Ces expériences représentent un niveau supplémentaire dans la protéomique basée sur la spectrométrie de masse qui a permis non seulement d'identifier des protéines mais également de mesurer quantitativement et de façon non biaisée la dynamique d'interaction des protéines en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, nous avons identifié plusieurs protéines associées aux protéines MCM, ce qui pourrait suggérer une implication de ces dernières dans le remodelage de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN. Nous avons donc pu montrer des variations de complexes protéiques sous différentes conditions. En particulier, nous avons pu mettre en évidence, principalement à la chromatine, une augmentation d'interaction entre les protéines MCM2 et ASF1A, une chaperonne d'histones jouant un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN (Franco et al. 2005; Mello et al. 2002; Schulz and Tyler 2006; Clément and Almouzni 2015). Et bien que la colocalisation entre MCM2 et γ H2AX ne soit que partielle, celle entre ASF1A et γ H2AX est bien plus importante. Cela nous a donc amené à nous intéresser à l'impact d'une diminution du complexe MCM sur la réponse cellulaire aux CDB.

Nous avons utilisé des shARN pour diminuer le niveau d'expression des protéines MCM. Cette diminution d'expression a entraîné une baisse des autres protéines du complexe MCM, baisse que nous assimilons à une déstabilisation du complexe MCM. Cette altération des protéines MCM semble modifier la signalisation des dommages à

l'ADN qui se traduit par une diminution de phosphorylation des protéines-clés de cette voie de signalisation : H2AX, CHK1 et CHK2. Et bien que cela diminue les capacités de la cellule à réparer les CDB par le mécanisme de la HR, cela n'altère en rien la sensibilité des cellules à l'étoposide.

Une approche protéomique se concentrant sur le phospho-protéome nous a permis d'identifier une diminution de phosphorylation de protéines connues pour être impliquées dans la HR comme ATM, BRCA1 et TopBP1, mais également une augmentation de phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans divers mécanismes de réparation. Alors que les protéines MCM semblent jouer un rôle dans la DDR, tant dans la signalisation que dans le mécanisme de la HR à un stade précoce, il n'est pas aisé de situer ce complexe MCM dans la cascade moléculaire de la réponse à l'étoposide.

Mais suite à l'ensemble de ces résultats, nous pouvons entrevoir deux hypothèses :
1) Le rôle du complexe MCM dans la DDR n'implique pas son activité hélicase ou 2)
L'activité hélicase du complexe MCM joue un rôle dans ce mécanisme de réparation.

6.1 Le rôle du complexe MCM dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par l'étoposide n'implique pas son activité hélicase

Alors que nous avons pu identifier un changement d'interaction entre les protéines MCM2, ASF1 et CDH3, ainsi qu'un impact sur la DDR, il n'a jamais été mis en évidence un rôle précis de l'activité hélicase du complexe MCM. Si l'activité hélicase n'est pas impliquée, les interactions entre MCM3 et CHK1, MCM7 et ATRIP, MCM2 et ATM, placent le complexe MCM au cœur des protéines de la réponse aux CDB. Pourrait-on alors considérer le complexe MCM comme une plateforme de recrutement ? Si c'est le cas, il est assez aisé de voir l'impact d'une diminution de ce complexe sur les voies de la DDR (Figure 40). Une diminution du complexe limiterait le recrutement d'ATM aux sites de CDB, diminuant ainsi la phosphorylation de H2AX et de CHK2. Par ailleurs, la protéine CHK1 ne pourrait plus être phosphorylée car son interaction avec MCM3 est nécessaire pour sa phosphorylation sur sa Sérine 345. Néanmoins, la colocalisation partielle de MCM2 avec γ H2AX laisse supposer que le complexe MCM ne se situerait pas directement

aux sites de CDB. L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité hélicase, tel que l'Héliquinomycine (Yukio Ishimi et al. 2009), un inhibiteur de l'activité ATPasique du sous-complexe MCM 4/6/7, nous permettrait de nous affranchir de l'activité hélicase du complexe MCM et de définir si l'ensemble des observations faites proviennent de l'absence structurelle du complexe MCM ou de la diminution de son activité d'hélicase. Il serait également possible de générer des plasmides exprimant les protéines MCM mutées sur leur motif Arginine. Cela empêcherait ainsi l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'activité hélicase du complexe MCM. L'utilisation de ces plasmides dans nos lignées cellulaires infectées avec nos shARN, ayant ainsi un complexe MCM déstabilisé, permettrait de mimer un complexe MCM sans activité hélicase.

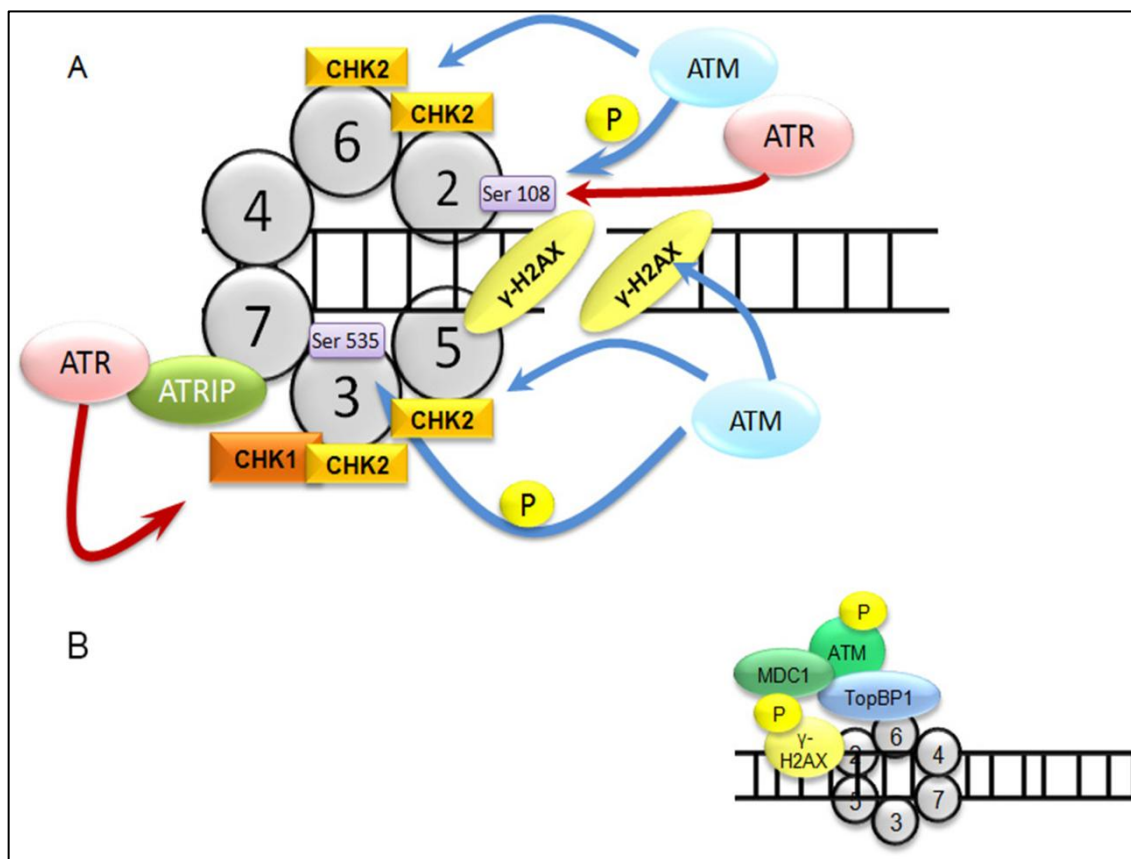


Figure 40. Postulat n°1 : Le complexe MCM servirait de plateforme de recrutement pour les protéines de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. (A) ATM peut interagir avec MCM2 qui peut être phosphorylée par ATM ou ATR en fonction des dommages à l'ADN. ATM peut phosphoryler MCM3. MCM7 interagit avec ATRIP, un partenaire d'ATR. Les protéines MCM2, MCM6, MCM3 et MCM5 peuvent interagir avec CHK2, protéine phosphorylée par ATM en réponse à des CDB. L'interaction MCM3/CHK1 est nécessaire pour la phosphorylation de cette dernière par ATR. **(B)** TopBP1 aide au recrutement d'ATM sur les sites de CDB, mais une diminution des MCM altère le recrutement de TopBP1.

6.2 L'activité hélicase du complexe MCM joue un rôle dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN

Le remodelage de la chromatine est un mécanisme primordial pour permettre la réparation de l'ADN. En effet, sans modification des nucléosomes, sans décompaction de l'ADN, ou encore sans ouverture de la double hélice d'ADN, les protéines de réparation ne pourraient pas être recrutées aux sites de CDB. De nombreux complexes ont été décrits pour jouer ce rôle, tant sur les modifications des nucléosomes par acétylation que sur l'ouverture de la double hélice d'ADN par des hélicases telles que WRN ou BLM par exemple. Néanmoins, tous ces processus semblent présenter des redondances et il n'est pas impossible de découvrir de nouvelles protéines impliquées dans ces mécanismes de réparation comme cela a été le cas pour la protéine UVRAG par exemple (Zhao et al. 2012).

Parmi tous ces processus, un mécanisme en particulier semble ne pas être détaillé : la première phosphorylation de H2AX suite à la présence d'une CDB. En effet, il est très largement décrit que H2AX est phosphorylée dans un délai de quelques minutes suivant l'apparition de CDB. Cela entraîne la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif menant à la création de foyers nucléaires. H2AX phosphorylée va permettre le recrutement de MDC1, qui permettra le recrutement du complexe MRN. Ce complexe, avec l'aide de la protéine TopBP1, permettra le recrutement et l'activation d'ATM qui viendra alors phosphoryler H2AX. De plus, l'activation d'ATM semble dépendante de son acétylation par la protéine Tip60 (Y. Sun et al. 2005), elle-même responsable de l'acétylation des histones. Ainsi, une diminution de phosphorylation de H2AX serait-elle due à un défaut de phosphorylation des premières H2AX ou un changement de conformation de la chromatine suite à une CDB serait-il responsable de l'activation de la protéine ATM et de la première phosphorylation d'H2AX ? La concentration élevée de complexes MCM sur l'ADN pourrait-elle jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome ? Plusieurs hélicases ont été décrites comme pouvant jouer un rôle dans la réparation des CDB comme BLM dans la HR (L. Wu et al. 2001). Néanmoins, l'hélicase BLM n'est recrutée qu'après ATM suggérant ainsi que si le complexe MCM devait intervenir, ce

serait en amont de BLM. Il serait alors intéressant d'étudier la phosphorylation et l'acétylation de la protéine ATM en réponse aux dommages à l'ADN suite à une diminution du complexe MCM. Cela permettrait de déterminer si une diminution du complexe MCM altère ou non l'activité de la protéine ATM. Si tel est le cas, cela pourrait bloquer soit son activation, soit son recrutement. Par ailleurs, il a été montré qu'une diminution des protéines MCM pouvait limiter le recrutement de la protéine TopBP1 (Xia et al. 2016) et MDC1 (Yu et al. 2016) aux sites de CDB. Cela pourrait induire un défaut de recrutement d'ATM aux sites de dommages. Nous pourrions ainsi discriminer l'origine de cette diminution de phosphorylation de H2AX et CHK2 : recrutement ou activation. Par ailleurs, si le complexe MCM présente une fonction d'hélicase, est-elle directement impliquée dans le remodelage de la chromatine ? Le complexe se déplacerait-il le long de l'ADN pour favoriser le recrutement des protéines de la réparation expliquant la colocalisation partielle de MCM2 et γ H2AX ? Une diminution de ce complexe entraînerait-elle une dérégulation de la HR compensée par une activation de la NHEJ en réponse à l'étoposide ? Alors que nous pouvons potentiellement placer le complexe MCM au cœur des protéines impliquées dans la DDR et plus particulièrement la HR, de nombreuses questions restent en suspens. Il serait donc nécessaire de mieux comprendre le rôle du complexe MCM dans la régulation des voies de signalisation et de réparation de l'ADN afin de chercher à optimiser ces effets pour des applications thérapeutiques.

Afin de mieux comprendre ce rôle des protéines MCM, il serait intéressant d'étudier les niveaux de phosphorylation d'autres protéines de la DDR telles qu'ATM sur sa Sérine 1981 (Bakkenist and Kastan 2003) et DNA-PKcs sur sa Sérine 2096 (B. P. C. Chen et al. 2006) lors d'une déstabilisation du complexe MCM en réponse aux CDB. En parallèle, une étude par immunofluorescence d'ATM phosphorylée, connue pour être recrutée aux sites de CDB, permettrait de déterminer si une baisse des MCM altérerait l'activation ou le recrutement de cette protéine. Cette étude doit être approfondie par l'identification des niveaux de fluorescence et du nombre de foyers formés. Ces derniers sont-ils toujours aussi nombreux mais moins intenses suite à une déstabilisation du complexe MCM ou le nombre de foyers diminue mais en conservant leur intensité ?

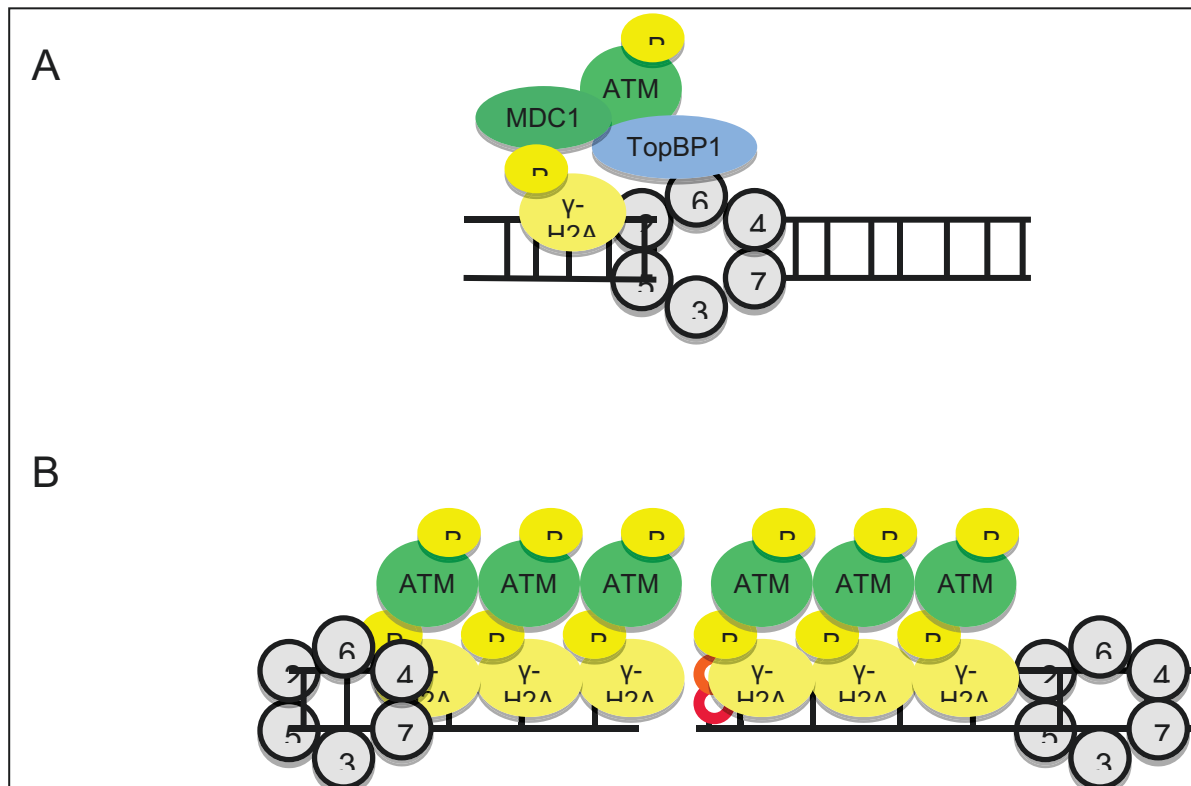


Figure 41. Postulat n°2 : Le complexe MCM joue un rôle sur le remodelage de la chromatine et facilite le recrutement des protéines de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. (A) MDC1 et TopBP1 sont recrutées aux sites de CDB suite à la présence de γ H2AX et s'associent pour permettre le recrutement d'ATM. Une diminution des MCM bloquerait le recrutement de MDC1 et TopBP1. **(B)** Suite à la première phosphorylation de H2AX, une boucle de rétrocontrôle positive se met en place permettant la formation de foyers nucléaires. Le complexe MCM pourrait être impliqué dans le remodelage de la chromatine permettant la formation de ces foyers nucléaires et le recrutement des protéines de la réparation.

En complément, le niveau d'acétylation d'ATM déterminerait si une diminution des protéines MCM pourrait altérer l'activation d'ATM. Une approche de la dynamique d'activation et de recrutement des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN devrait être effectuée. Une combinaison d'immunofluorescences et d'études de phosphorylation des protéines telles qu'ATM, DNA-PKcs, H2AX ou encore CHK2 à des temps de traitement variés permettraient de répondre à cette question. Avec notre hypothèse d'une modulation de l'activation de la protéine ATM, il serait bon de savoir si, à des temps de traitements plus courts, la phosphorylation de H2AX est toujours aussi rapide suite à une diminution des MCM ou si la présence du complexe MCM est nécessaire et est-ce que le recrutement d'ATM serait retardé ? En parallèle, une approche de spectrométrie de masse permettrait d'étudier la dynamique d'interaction aux abords des sites de CDB.

Cette étude pourrait être réalisée grâce à des étiquettes BirA (Fairhead and Howarth 2015) et APEX2 (Lam et al. 2015) qui sont des protéines biotine ligase et qui permettent une biotinylation des protéines présentes dans un environnement proche.

L'utilisation de l'étoposide comme agent générateur de CDB semble être plus que pertinent à la vue des résultats. En effet, il nous permet d'étudier la réponse cellulaire et les mécanismes d'action activés suite à ces dommages et de pouvoir statuer de manière certaine sur le rôle précis du complexe MCM dans le mécanisme de la HR.

De manière intéressante, il est connu que la protéine ASF1A recrute la protéine HP-1 (Yamane et al. 2011) aux sites de CDB sur l'hétérochromatine et que la protéine CHD3 est impliquée dans le maintien de cette structure (Smeenk et al. 2010; Goodarzi, Kurka, and Jeggo 2011). De plus, la décompaction de l'hétérochromatine en réponse à des CDB est encore sujette à discussion. Il serait alors intéressant dans le futur de rechercher si le complexe MCM pourrait avoir un rôle à jouer dans cette structure précise de l'ADN, où le mécanisme de décompaction suite à la présence de CDB reste encore à élucider.

En réponse à l'étoposide, les protéines MCM vont changer de localisation en faveur du noyau. De nouveaux partenaires d'interaction ont pu être identifiés avec une augmentation d'interaction entre MCM2 et ASF1, Paladin et Importin 7 mais une diminution de l'interaction entre MCM2 et CHD3. Par ailleurs les protéines ASF1A et γ H2AX colocalisent en réponse à un traitement à l'étoposide. De plus, la déstabilisation du complexe MCM entraîne une altération de la signalisation des CDB et du mécanisme de réparation par recombinaison homologue bien que les cellules ne deviennent pas plus sensibles à l'étoposide.

Cette possible implication du complexe MCM dans la HR laisse penser que ces protéines pourraient devenir de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, les protéines de la HR ont été des cibles thérapeutiques et il a été montré qu'une altération de la protéine ATM sensibilisait les cellules à un inhibiteur de PARP1 (Aguilar-Quesada et al. 2007). Ainsi, toute nouvelle protéine pouvant être impliquée dans la DDR apparaîtrait alors comme une cible thérapeutique potentielle.

- Adimoolam, Shanthi, Mint Sirisawad, Jun Chen, Patti Thiemann, James M Ford, and Joseph J Buggy. 2007. "HDAC Inhibitor PCI-24781 Decreases RAD51 Expression and Inhibits Homologous Recombination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49). National Academy of Sciences: 19482–87.
- Aguilar-Quesada, Rocio, Jose Munoz-Gamez, David Martin-Oliva, Andreina Peralta, Ma Teresa Valenzuela, Ruben Martinez-Romero, Rosa Quiles-Perez, et al. 2007. "Interaction between ATM and PARP-1 in Response to DNA Damage and Sensitization of ATM Deficient Cells through PARP Inhibition." *BMC Molecular Biology* 8 (1): 29.
- Ahel, D., Z. Horejsi, N. Wiechens, S. E. Polo, E. Garcia-Wilson, I. Ahel, H. Flynn, et al. 2009. "Poly(ADP-Ribose)-Dependent Regulation of DNA Repair by the Chromatin Remodeling Enzyme ALC1." *Science* 325 (5945): 1240–43.
- Ahn, J., and C. Prives. 2002. "Checkpoint Kinase 2 (Chk2) Monomers or Dimers Phosphorylate Cdc25C after DNA Damage Regardless of Threonine 68 Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48418–26.
- Ahn, J Y, J K Schwarz, H Piwnica-Worms, and C E Canman. 2000. "Threonine 68 Phosphorylation by Ataxia Telangiectasia Mutated Is Required for Efficient Activation of Chk2 in Response to Ionizing Radiation." *Cancer Research* 60 (21): 5934–36.
- Akopiants, Konstantin, Rui-Zhe Zhou, Susovan Mohapatra, Kristoffer Valerie, Susan P Lees-Miller, Kyung-Jong Lee, David J Chen, Patrick Revy, Jean-Pierre de Villartay, and Lawrence F Povirk. 2009. "Requirement for XLF/Cernunnos in Alignment-Based Gap Filling by DNA Polymerases Lambda and Mu for Nonhomologous End Joining in Human Whole-Cell Extracts." *Nucleic Acids Research* 37 (12). Oxford University Press: 4055–62.
- Alexander, A., S.-L. Cai, J. Kim, A. Nanez, M. Sahin, K. H. MacLean, K. Inoki, et al. 2010. "ATM Signals to TSC2 in the Cytoplasm to Regulate mTORC1 in Response to ROS." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (9): 4153–58.
- Alsop, Kathryn, Sian Fereday, Cliff Meldrum, Anna DeFazio, Catherine Emmanuel, Joshy George, Alexander Dobrovic, et al. 2012. "BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation?Positive Women With Ovarian Cancer: A

- Report From the Australian Ovarian Cancer Study Group." *Journal of Clinical Oncology* 30 (21): 2654–63.
- Amin, N S, M N Nguyen, S Oh, and R D Kolodner. 2001. "exo1-Dependent Mutator Mutations: Model System for Studying Functional Interactions in Mismatch Repair." *Molecular and Cellular Biology* 21 (15): 5142–55.
- Andersen, Jens S, Carol E Lyon, Archa H Fox, Anthony K L Leung, Yun Wah Lam, Hanno Steen, Matthias Mann, and Angus I Lamond. 2002. "Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus." *Current Biology : CB* 12 (1): 1–11.
- Andersen, Jens S, and Matthias Mann. 2006. "Organellar Proteomics: Turning Inventories into Insights." *EMBO Reports* 7 (9): 874–79.
- Andres, Sara N., Mauro Modesti, Chun J. Tsai, Gilbert Chu, and Murray S. Junop. 2007. "Crystal Structure of Human XLF: A Twist in Nonhomologous DNA End-Joining." *Molecular Cell* 28 (6): 1093–1101.
- Andres, Sara N., Alexandra Vergnes, Dejan Ristic, Claire Wyman, Mauro Modesti, and Murray Junop. 2012. "A Human XRCC4/XLF Complex Bridges DNA." *Nucleic Acids Research* 40 (4): 1868–78.
- Aparicio, O M, D M Weinstein, and S P Bell. 1997. "Components and Dynamics of DNA Replication Complexes in *S. Cerevisiae*: Redistribution of MCM Proteins and Cdc45p during S Phase." *Cell* 91 (1): 59–69.
- Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou. 2004. "Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-Strand Breaks Rejoining." *Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55117–26.
- Audebert, Marc, Bernard Salles, and Patrick Calsou. 2004. "Involvement of poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-Strand Breaks Rejoining." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55117–26.
- Bakkenist, Christopher J, and Michael B Kastan. 2003. "DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation." *Nature* 421 (6922): 499–506.

- Baldeyron, Céline, Gaston Soria, Danièle Roche, Adam J. L. Cook, and Geneviève Almouzni. 2011. "HP1 α Recruitment to DNA Damage by p150CAF-1 Promotes Homologous Recombination Repair." *The Journal of Cell Biology* 193 (1): 81–95.
- Banin, S, L Moyal, S Shieh, Y Taya, C W Anderson, L Chessa, N I Smorodinsky, et al. 1998. "Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage." *Science (New York, N.Y.)* 281 (5383): 1674–77.
- Bauerle, M., Detlef Doenecke, and Werner Albig. 2002. "The Requirement of H1 Histones for a Heterodimeric Nuclear Import Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 277(36):32480–89.
- Beamish, Heather, Padmini Kedar, Hideo Kaneko, Philip Chen, Toshiyuki Fukao, Cheng Peng, Sergei Beresten, et al. 2002. "Functional Link between BLM Defective in Bloom's Syndrome and the Ataxia-Telangiectasia-Mutated Protein, ATM." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30515–23.
- Bell, Stephen P., and Anindya Dutta. 2002. "DNA Replication in Eukaryotic Cells." *Annual Review of Biochemistry* 71 (1): 333–74.
- Bennardo, Nicole, Anita Cheng, Nick Huang, and Jeremy M Stark. 2008. "Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair." Edited by James E. Haber. *PLoS Genetics* 4 (6): e1000110.
- Bergmann, E, and J M Egly. 2001. "Trichothiodystrophy, a Transcription Syndrome." *Trends in Genetics : TIG* 17 (5): 279–86.
- Bernstein, Kara A., Serge Gangloff, and Rodney Rothstein. 2010. "The RecQ DNA Helicases in DNA Repair." *Annual Review of Genetics* 44 (1): 393–417.
- Beucher, Andrea, Julie Birraux, Leopoldine Tchouandong, Olivia Barton, Atsushi Shibata, Sandro Conrad, Aaron A Goodarzi, Andrea Krempler, Penny A Jeggo, and Markus Löbrich. 2009. "ATM and Artemis Promote Homologous Recombination of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in G2." *The EMBO Journal* 28 (21): 3413–27.
- Blasina, A, I V de Weyer, M C Laus, W H Luyten, A E Parker, and C H McGowan. 1999. "A Human Homologue of the Checkpoint Kinase Cds1 Directly Inhibits Cdc25 Phosphatase." *Current Biology : CB* 9 (1): 1–10.

- Bochman, M. L., S. P. Bell, and A. Schwacha. 2008. "Subunit Organization of Mcm2-7 and the Unequal Role of Active Sites in ATP Hydrolysis and Viability." *Molecular and Cellular Biology* 28 (19): 5865–73.
- Bochman, Matthew L., and Anthony Schwacha. 2008. "The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity." *Molecular Cell* 31 (2): 287–93.
- Boddy, M N, P H Gaillard, W H McDonald, P Shanahan, J R Yates, and P Russell. 2001. "Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase." *Cell* 107 (4): 537–48.
- Boisvert, F.-M., Y. Ahmad, M. Gierlinski, F. Charriere, D. Lamont, M. Scott, G. Barton, and A. I. Lamond. 2012. "A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells." *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (3): M111.011429-M111.011429.
- Boisvert, F.-M., Y. W. Lam, D. Lamont, and A. I. Lamond. 2010. "A Quantitative Proteomics Analysis of Subcellular Proteome Localization and Changes Induced by DNA Damage." *Molecular & Cellular Proteomics* 9 (3): 457–70.
- Bont, Rinne De, and Nik van Larebeke. 2004. "Endogenous DNA Damage in Humans: A Review of Quantitative Data." *Mutagenesis* 19 (3): 169–85.
- Boos, Dominik, Jordi Frigola, and John F X Diffley. 2012. "Activation of the Replicative DNA Helicase: Breaking up Is Hard to Do." *Current Opinion in Cell Biology* 24 (3): 423–30.
- Bowers, J, P T Tran, A Joshi, R M Liskay, and E Alani. 2001. "MSH-MLH Complexes Formed at a DNA Mismatch Are Disrupted by the PCNA Sliding Clamp." *Journal of Molecular Biology* 306 (5): 957–68.
- Braybrooke, Jeremy P, Ji-Liang Li, Leonard Wu, Fiona Caple, Fiona E Benson, and Ian D Hickson. 2003. "Functional Interaction between the Bloom's Syndrome Helicase and the RAD51 Paralog, RAD51L3 (RAD51D)." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 48357–66.
- Budke, Brian, Hillary L. Logan, Jay H. Kalin, Anna S. Zelivianskaia, William Cameron McGuire, Luke L. Miller, Jeremy M. Stark, Alan P. Kozikowski, Douglas K. Bishop, and Philip P. Connell. 2012. "RI-1: A Chemical Inhibitor of RAD51 That Disrupts

- Homologous Recombination in Human Cells.” *Nucleic Acids Research* 40 (15): 7347–57.
- Burgers, P. M. J., E. V. Koonin, E. Bruford, L. Blanco, K. C. Burtis, M. F. Christman, W. C. Copeland, et al. 2001. “Eukaryotic DNA Polymerases: Proposal for a Revised Nomenclature.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 43487–90.
- Burma, S., B P Chen, M Murphy, A Kurimasa, and D J Chen. 2001. “ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42462–67.
- Buscemi, Giacomo, Paola Perego, Nives Carenini, Makoto Nakanishi, Luciana Chessa, Junjie Chen, Kumkum Khanna, and Domenico Delia. 2004. “Activation of ATM and Chk2 Kinases in Relation to the Amount of DNA Strand Breaks.” *Oncogene* 23 (46): 7691–7700.
- Byun, T. S., Marcin Pacek, Muh-ching Yee, Johannes C Walter, and Karlene A Cimprich. 2005. “Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint.” *Genes & Development* 19 (9): 1040–52.
- Cai, Zhenjian, Nabil H. Chehab, and Nikola P. Pavletich. 2009. “Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase.” *Molecular Cell* 35 (6): 818–29.
- Calsou, Patrick, Christine Delteil, Philippe Frit, Jérôme Drouet, and Bernard Salles. 2003. “Coordinated Assembly of Ku and p460 Subunits of the DNA-Dependent Protein Kinase on DNA Ends Is Necessary for XRCC4-Ligase IV Recruitment.” *Journal of Molecular Biology* 326 (1): 93–103.
- Canfield, Caroline, Justin Rains, and Arrigo De Benedetti. 2009. “TLK1B Promotes Repair of DSBs via Its Interaction with Rad9 and Asf1.” *BMC Molecular Biology* 10 (December). BioMed Central: 110.
- Carney, J P, R S Maser, H Olivares, E M Davis, M Le Beau, J R Yates, L Hays, W F Morgan, and J H Petrini. 1998. “The hMre11/hRad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response.” *Cell* 93 (3): 477–86.

- Chan, D. W., Benjamin Ping-Chi Chen, Sheela Prithivirajasingh, Akihiro Kurimasa, Michael D Story, Jun Qin, and David J Chen. 2002. "Autophosphorylation of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Required for Rejoining of DNA Double-Strand Breaks." *Genes & Development* 16 (18): 2333–38.
- Chan, Doug W., Ruiqiong Ye, Christian J. Veillette, and Susan P. Lees-Miller. 1999. "DNA-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites in Ku 70/80 Heterodimer?" *Biochemistry* 38 (6): 1819–28.
- Chappell, C., Les A Hanakahi, Feridoun Karimi-Busheri, Michael Weinfeld, and Stephen C West. 2002. "Involvement of Human Polynucleotide Kinase in Double-Strand Break Repair by Non-Homologous End Joining." *The EMBO Journal* 21 (11): 2827–32.
- Chaturvedi, Priya, Wai K Eng, Yuan Zhu, Michael R Mattern, Rubin Mishra, Mark R Hurle, Xiaolong Zhang, et al. 1999. "Mammalian Chk2 Is a Downstream Effector of the ATM-Dependent DNA Damage Checkpoint Pathway." *Oncogene* 18 (28): 4047–54.
- Chen, B. P. C., N. Uematsu, J. Kobayashi, Y. Lerenthal, A. Krempler, H. Yajima, M. Lobrich, Y. Shiloh, and D. J. Chen. 2006. "Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Is Essential for DNA-PKcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster upon DNA Double Strand Break." *Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6582–87.
- Chen, Chin-Chuan, Joshua J. Carson, Jason Feser, Beth Tamburini, Susan Zabaronick, Jeffrey Linger, and Jessica K. Tyler. 2008. "Acetylated Lysine 56 on Histone H3 Drives Chromatin Assembly after Repair and Signals for the Completion of Repair." *Cell* 134 (2): 231–43.
- Chen, L., K Trujillo, P Sung, and A E Tomkinson. 2000. "Interactions of the DNA Ligase IV-XRCC4 Complex with DNA Ends and the DNA-Dependent Protein Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 275 (34): 26196–205.
- Chen, Lishan, Shurong Huang, Lin Lee, Albert Davalos, Robert H Schiestl, Judith Campisi, and Junko Oshima. 2003. "WRN, the Protein Deficient in Werner Syndrome, Plays a Critical Structural Role in Optimizing DNA Repair." *Aging Cell* 2 (4): 191–99.
- Chen, Siying, Mikhail K Levin, Miho Sakato, Yayan Zhou, and Manju M Hingorani. 2009. "Mechanism of ATP-Driven PCNA Clamp Loading by *S. Cerevisiae* RFC." *Journal of*

- Molecular Biology* 388 (3): 431–42.
- Choi, Seung Ho, and Hae Yong Yoo. 2016a. “Mdc1 Modulates the Interaction between TopBP1 and the MRN Complex during DNA Damage Checkpoint Responses.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479 (1): 5–11.
- Chomzynski, P, and N Sacchi. 1987. “Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate?Phenol?Chloroform Extraction.” *Analytical Biochemistry* 162 (1): 156–59.
- Chu, G, and E Chang. 1988. “Xeroderma Pigmentosum Group E Cells Lack a Nuclear Factor That Binds to Damaged DNA.” *Science (New York, N.Y.)* 242 (4878): 564–67.
- Clark, A B, F Valle, K Drotschmann, R K Gary, and T A Kunkel. 2000. “Functional Interaction of Proliferating Cell Nuclear Antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 Complexes.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (47): 36498–501.
- Clément, Camille, and Geneviève Almouzni. 2015. “MCM2 Binding to Histones H3–H4 and ASF1 Supports a Tetramer-to-Dimer Model for Histone Inheritance at the Replication Fork.” *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (8): 587–89.
- Coin, Frédéric, Valentyn Oksenych, and Jean-Marc Egly. 2007. “Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair.” *Molecular Cell* 26 (2): 245–56.
- Coin, Frédéric, Valentyn Oksenych, Vincent Mocquet, Stefanie Groh, Christine Blattner, and Jean Marc Egly. 2008. “Nucleotide Excision Repair Driven by the Dissociation of CAK from TFIIH.” *Molecular Cell* 31 (1): 9–20.
- Compe, Emmanuel, and Jean-Marc Egly. 2012. “TFIIH: When Transcription Met DNA Repair.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (6): 343–54.
- Cook, Peter J., Bong Gun Ju, Francesca Telese, Xiangting Wang, Christopher K. Glass, and Michael G. Rosenfeld. 2009. “Tyrosine Dephosphorylation of H2AX Modulates Apoptosis and Survival Decisions.” *Nature* 458 (7238). Nature Publishing Group: 591–96.
- Cooper, M P, A Machwe, D K Orren, R M Brosh, D Ramsden, and V A Bohr. 2000. “Ku Complex Interacts with and Stimulates the Werner Protein.” *Genes & Development*

14 (8): 907–12.

- Cortez, D., S Guntuku, J Qin, and S J Elledge. 2001. "ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling." *Science* 294 (5547): 1713–16.
- Cortez, David, Gloria Glick, and Stephen J Elledge. 2004. "Minichromosome Maintenance Proteins Are Direct Targets of the ATM and ATR Checkpoint Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27): 10078–83.
- Cortez, D, Y Wang, J Qin, and S J Elledge. 1999. "Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of brca1 in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks." *Science* 286 (5442): 1162–66.
- Costa, Renata M A, Vanessa Chiganças, Rodrigo da Silva Galhardo, Helotonio Carvalho, and Carlos F M Menck. 2003. "The Eukaryotic Nucleotide Excision Repair Pathway." *Biochimie* 85 (11): 1083–99.
- Cuadrado, Myriam, Barbara Martinez-Pastor, Matilde Murga, Luis I. Toledo, Paula Gutierrez-Martinez, Eva Lopez, and Oscar Fernandez-Capetillo. 2006. "ATM Regulates ATR Chromatin Loading in Response to DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (2): 297–303.
- Cui, Yushang, Xiaohui Xu, Cheng Huang, Yingzhi Qin, Naixin Liang, Hongsheng Liu, and Shanqing Li. 2017. "Minichromosome Maintenance Complex Facilitates the Recruitment of BRCA1 onto Chromatin and Foci Formation in A549 Cells." *Int J Clin Exp Pathol* 10 (2): 1611–18. www.ijcep.com.
- Davey, M. J., C. Indiani, and M. O'Donnell. 2003. "Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture." *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4491–99.
- Davies, A A, J Y Masson, M J McIlwraith, A Z Stasiak, A Stasiak, A R Venkitaraman, and S C West. 2001. "Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein." *Molecular Cell* 7 (2): 273–82.
- Delacroix, Sinny, Jill M Wagner, Masahiko Kobayashi, Ken-ichi Yamamoto, and Larry M Karnitz. 2007. "The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) Clamp Activates Checkpoint Signaling via

- TopBP1." *Genes & Development* 21 (12). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1472–77.
- Dimitrova, D S, I T Todorov, T Melendy, and D M Gilbert. 1999. "Mcm2, but Not RPA, Is a Component of the Mammalian Early G1-Phase Prereplication Complex." *The Journal of Cell Biology* 146 (4): 709–22.
- Dobbs, Tracey A., John A. Tainer, and Susan P. Lees-Miller. 2010. "A Structural Model for Regulation of NHEJ by DNA-PKcs Autophosphorylation." *DNA Repair* 9 (12): 1307–14.
- Drissi, Romain, Marie-Line Dubois, Mélanie Douziech, and François-Michel Boisvert. 2015. "Quantitative Proteomics Reveals Dynamic Interactions of the Minichromosome Maintenance Complex (MCM) in the Cellular Response to Etoposide Induced DNA Damage." *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (7): 2002–13.
- Drummond, J T, G M Li, M J Longley, and P Modrich. 1995. "Isolation of an hMSH2-p160 Heterodimer That Restores DNA Mismatch Repair to Tumor Cells." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5219): 1909–12.
- Dunand-Sauthier, I., M. Hohl, F. Thorel, P. Jaquier-Gubler, S. G. Clarkson, and O. D. Scharer. 2005. "The Spacer Region of XPG Mediates Recruitment to Nucleotide Excision Repair Complexes and Determines Substrate Specificity." *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 7030–37.
- Durocher, D, J Henckel, A R Fersht, and S P Jackson. 1999. "The FHA Domain Is a Modular Phosphopeptide Recognition Motif." *Molecular Cell* 4 (3): 387–94.
- Dzantiev, Leonid, Nicoleta Constantin, Jochen Genschel, Ravi R Iyer, Peter M Burgers, and Paul Modrich. 2004. "A Defined Human System That Supports Bidirectional Mismatch-Provoked Excision." *Molecular Cell* 15 (1): 31–41.
- el-Deiry, W S, J W Harper, P M O'Connor, V E Velculescu, C E Canman, J Jackman, J A Pietenpol, M Burrell, D E Hill, and Y Wang. 1994. "WAF1/CIP1 Is Induced in p53-Mediated G1 Arrest and Apoptosis." *Cancer Research* 54 (5): 1169–74.
- el-Deiry, W S, T Tokino, V E Velculescu, D B Levy, R Parsons, J M Trent, D Lin, W E Mercer, K W Kinzler, and B Vogelstein. 1993. "WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression." *Cell* 75 (4): 817–25.

- English, J S, and A J Swerdlow. 1987. "The Risk of Malignant Melanoma, Internal Malignancy and Mortality in Xeroderma Pigmentosum Patients." *The British Journal of Dermatology* 117 (4): 457–61.
- Erzberger, Jan P, Melissa L Mott, and James M Berger. 2006. "Structural Basis for ATP-Dependent DnaA Assembly and Replication-Origin Remodeling." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (8): 676–83.
- Esashi, Fumiko, Nicole Christ, Julian Gannon, Yilun Liu, Tim Hunt, Maria Jasin, and Stephen C. West. 2005. "CDK-Dependent Phosphorylation of BRCA2 as a Regulatory Mechanism for Recombinational Repair." *Nature* 434 (7033): 598–604.
- Fairhead, Michael, and Mark Howarth. 2015. "Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1266. Europe PMC Funders: 171–84.
- Falck, Jacob, John H J Petrini, Bret R Williams, Jiri Lukas, and Jiri Bartek. 2002. "The DNA Damage-Dependent Intra-S Phase Checkpoint Is Regulated by Parallel Pathways." *Nature Genetics* 30 (3): 290–94.
- Falck, J, N Mailand, R G Syljuåsen, J Bartek, and J Lukas. 2001. "The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis." *Nature* 410 (6830): 842–47.
- Flores-Rozas, H, D Clark, and R D Kolodner. 2000. "Proliferating Cell Nuclear Antigen and Msh2p-Msh6p Interact to Form an Active Mismatch Recognition Complex." *Nature Genetics* 26 (3): 375–78.
- Foltman, Magdalena, Cecile Evrin, Giacomo De Piccoli, Richard C Jones, Rick D Edmondson, Yuki Katou, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, and Karim Labib. 2013. "Eukaryotic Replisome Components Cooperate to Process Histones during Chromosome Replication." *Cell Reports* 3 (3): 892–904.
- Forsburg, Susan L. 2004. "Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 68 (1): 109–31.
- Fortini, P, E Parlanti, O M Sidorkina, J Laval, and E Dogliotti. 1999. "The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells." *The*

- Journal of Biological Chemistry* 274 (21): 15230–36.
- Fousteri, Maria, Wim Vermeulen, Albert A. van Zeeland, and Leon H.F. Mullenders. 2006. "Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo." *Molecular Cell* 23 (4): 471–82.
- Fraga, C G, M K Shigenaga, J W Park, P Degan, and B N Ames. 1990. "Oxidative Damage to DNA during Aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rat Organ DNA and Urine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12): 4533–37.
- Franco, Alexa A, Wendy M Lam, Peter M Burgers, and Paul D Kaufman. 2005. "Histone Deposition Protein Asf1 Maintains DNA Replisome Integrity and Interacts with Replication Factor C." *Genes & Development* 19 (11). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1365–75.
- Frosina, G, P Fortini, O Rossi, F Carrozzino, G Raspaglio, L S Cox, D P Lane, A Abbondandolo, and E Dogliotti. 1996. "Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9573–78.
- Furuta, Takahisa, Haruyuki Takemura, Zhi-Yong Liao, Gregory J Aune, Christophe Redon, Olga A Sedelnikova, Duane R Pilch, et al. 2003. "Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-Dependent DNA Double-Strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 20303–12.
- Gatei, M., K. Sloper, C. Sorensen, R. Syljuasen, J. Falck, K. Hobson, K. Savage, et al. 2003. "Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) and NBS1-Dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation." *Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14806–11.
- Genschel, Jochen, and Paul Modrich. 2003. "Mechanism of 5'-directed Excision in Human Mismatch Repair." *Molecular Cell* 12 (5): 1077–86.
- Goldberg, Michal, Manuel Stucki, Jacob Falck, Damien D'Amours, Dinah Rahman, Darryl Pappin, Jiri Bartek, and Stephen P. Jackson. 2003. "MDC1 Is Required for the Intra-S-

- Phase DNA Damage Checkpoint." *Nature* 421 (6926): 952–56.
- Golub, E I, R C Gupta, T Haaf, M S Wold, and C M Radding. 1998. "Interaction of Human rad51 Recombination Protein with Single-Stranded DNA Binding Protein, RPA." *Nucleic Acids Research* 26 (23): 5388–93.
- Goodarzi, Aaron A, Thomas Kurka, and Penelope A Jeggo. 2011. "KAP-1 Phosphorylation Regulates CHD3 Nucleosome Remodeling during the DNA Double-Strand Break Response." *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (7): 831–39.
- Gorrini, Chiara, Massimo Squatrito, Chiara Luise, Nelofer Syed, Daniele Perna, Landon Wark, Francesca Martinato, et al. 2007. "Tip60 Is a Haplo-Insufficient Tumour Suppressor Required for an Oncogene-Induced DNA Damage Response." *Nature* 448 (7157): 1063–67.
- Gospodinov, Anastas, Irina Tsaneva, and Boyka Anachkova. 2009. "RAD51 Foci Formation in Response to DNA Damage Is Modulated by TIP49." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (4): 925–33.
- Gottschalk, Aaron J, Gyula Timinszky, Stephanie E Kong, Jingji Jin, Yong Cai, Selene K Swanson, Michael P Washburn, et al. 2009. "Poly(ADP-Ribosyl)ation Directs Recruitment and Activation of an ATP-Dependent Chromatin Remodeler." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33): 13770–74.
- Grawunder, U, D Zimmer, P Kulesza, and M R Lieber. 1998. "Requirement for an Interaction of XRCC4 with DNA Ligase IV for Wild-Type V(D)J Recombination and DNA Double-Strand Break Repair in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (38). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 24708–14.
- Gregg, Siobhán Q, Andria Rasile Robinson, and Laura J Niedernhofer. 2011. "Physiological Consequences of Defects in ERCC1-XPF DNA Repair Endonuclease." *DNA Repair* 10 (7): 781–91.
- Grundy, Gabrielle J, Stuart L Rulten, Zhihong Zeng, Raquel Arribas-Bosacoma, Natasha Iles, Katie Manley, Antony Oliver, and Keith W Caldecott. 2013. "APLF Promotes the Assembly and Activity of Non-Homologous End Joining Protein Complexes." *The*

- EMBO Journal* 32 (1). European Molecular Biology Organization: 112–25.
- Gu, L, Y Hong, S McCulloch, H Watanabe, and G M Li. 1998. "ATP-Dependent Interaction of Human Mismatch Repair Proteins and Dual Role of PCNA in Mismatch Repair." *Nucleic Acids Research* 26 (5): 1173–78.
- Guo, Shuangli, Steven R Presnell, Fenghua Yuan, Yanbin Zhang, Liya Gu, and Guo-Min Li. 2004. "Differential Requirement for Proliferating Cell Nuclear Antigen in 5' and 3' Nick-Directed Excision in Human Mismatch Repair." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (17): 16912–17.
- Guo, Shuangli, Yanbin Zhang, Fenghua Yuan, Yin Gao, Liya Gu, Isaac Wong, and Guo-Min Li. 2006. "Regulation of Replication Protein A Functions in DNA Mismatch Repair by Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (31): 21607–16.
- Guo, Z, A Kumagai, S X Wang, and W G Dunphy. 2000. "Requirement for Atr in Phosphorylation of Chk1 and Cell Cycle Regulation in Response to DNA Replication Blocks and UV-Damaged DNA in Xenopus Egg Extracts." *Genes & Development* 14 (21): 2745–56.
- Hakem, Razqallah. 2008. "DNA-Damage Repair; the Good, the Bad, and the Ugly." *The EMBO Journal* 27 (4): 589–605.
- Hammel, Michal, Yaping Yu, Brandi L Mahaney, Brandon Cai, Ruiqiong Ye, Barry M Phipps, Robert P Rambo, et al. 2010. "Ku and DNA-Dependent Protein Kinase Dynamic Conformations and Assembly Regulate DNA Binding and the Initial Non-Homologous End Joining Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 1414–23.
- Han, X., A. Aslanian, K. Fu, T. Tsuji, and Y. Zhang. 2014. "The Interaction between Checkpoint Kinase 1 (Chk1) and the Minichromosome Maintenance (MCM) Complex Is Required for DNA Damage-Induced Chk1 Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 289 (35): 24716–23.
- Han, Xiangzi, Aaron Aslanian, Kang Fu, Toshiya Tsuji, and Youwei Zhang. 2014. "The Interaction between Checkpoint Kinase 1 (Chk1) and the Minichromosome Maintenance (MCM) Complex Is Required for DNA Damage-Induced Chk1

- Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (35): 24716–23.
- Han, Xiangzi, Franklin Mayca Pozo, Jacob N Wisotsky, Benlian Wang, James W Jacobberger, and Youwei Zhang. 2015. "Phosphorylation of Minichromosome Maintenance 3 (MCM3) by Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Negatively Regulates DNA Replication and Checkpoint Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (19): 12370–78.
- Hartford, Suzanne A. et al. 2016. "Interaction with PALB2 Is Essential for Maintenance of Genomic Integrity by BRCA2" edited by P. McKinnon. *PLOS Genetics* 12(8):e1006236.
- Helbock, H J, K B Beckman, M K Shigenaga, P B Walter, A A Woodall, H C Yeo, and B N Ames. 1998. "DNA Oxidation Matters: The HPLC-Electrochemical Detection Assay of 8-Oxo-Deoxyguanosine and 8-Oxo-Guanine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 288–93.
- Hentges, Pierre, Helen Waller, Clara C. Reis, Miguel Godinho Ferreira, and Aidan J. Doherty. 2014. "Cdk1 Restrains NHEJ through Phosphorylation of XRCC4-like Factor Xlf1." *Cell Reports* 9 (6): 2011–17.
- Hershko, A, H Heller, S Elias, and A Ciechanover. 1983. "Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown." *The Journal of Biological Chemistry* 258 (13): 8206–14.
- Hirao, A, Y Y Kong, S Matsuoka, A Wakeham, J Ruland, H Yoshida, D Liu, S J Elledge, and T W Mak. 2000. "DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2." *Science (New York, N.Y.)* 287 (5459): 1824–27.
- Hoeijmakers, J H. 1993. "Nucleotide Excision Repair I: From E. Coli to Yeast." *Trends in Genetics : TIG* 9 (5): 173–77.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009. "Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists." *Nucleic Acids Research* 37 (1): 1–13.
- Huang, Da Wei, Brad T Sherman, and Richard A Lempicki. 2008. "Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources." *Nature Protocols* 4 (1): 44–57.

- Huang, Shih-Min A., Michael K. Hancock, Jeffrey L. Pitman, Anthony P. Orth, and Nicholas Gekakis. 2009. "Negative Regulators of Insulin Signaling Revealed in a Genome-Wide Functional Screen" edited by K. Maedler. *PLoS ONE* 4(9):e6871.
- Huang, Xuan, H Dorota Halicka, and Zbigniew Darzynkiewicz. 2004. "Detection of Histone H2AX Phosphorylation on Ser-139 as an Indicator of DNA Damage (DNA Double-Strand Breaks)." *Current Protocols in Cytometry* Chapter 7 (November). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.: Unit 7.27.
- Hyrien, Olivier, Kathrin Marheineke, and Arach Goldar. 2003. "Paradoxes of Eukaryotic DNA Replication: MCM Proteins and the Random Completion Problem." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 25 (2): 116–25.
- Ibarra, Arkaitz, Etienne Schwob, and Juan Méndez. 2008. "Excess MCM Proteins Protect Human Cells from Replicative Stress by Licensing Backup Origins of Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (26): 8956–61.
- Iles, Natasha, Stuart Rulten, Sherif F El-Khamisy, and Keith W Caldecott. 2007. "APLF (C2orf13) Is a Novel Human Protein Involved in the Cellular Response to Chromosomal DNA Strand Breaks." *Molecular and Cellular Biology* 27 (10): 3793–3803.
- Im, Jun-Sub, Sang-Hee Ki, Andrea Farina, Dong-Soo Jung, Jerard Hurwitz, and Joon-Kyu Lee. 2009. "Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS Complex in Human Cells Requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15628–32.
- Ishimi, Y, and Y Komamura-Kohno. 2001. "Phosphorylation of Mcm4 at Specific Sites by Cyclin-Dependent Kinase Leads to Loss of Mcm4,6,7 Helicase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 34428–33.
- Ishimi, Yukio, Takafumi Sugiyama, Ryou Nakaya, Makoto Kanamori, Toshiyuki Kohno, Takemi Enomoto, and Makoto Chino. 2009. "Effect of Heliquinomycin on the Activity of Human Minichromosome Maintenance 4/6/7 Helicase." *FEBS Journal* 276 (12): 3382–91.

- Ito, Shinsuke, Isao Kuraoka, Pierre Chymkowitch, Emmanuel Compe, Arato Takedachi, Chie Ishigami, Frédéric Coin, Jean-Marc Egly, and Kiyoji Tanaka. 2007. "XPG Stabilizes TFIIH, Allowing Transactivation of Nuclear Receptors: Implications for Cockayne Syndrome in XP-G/CS Patients." *Molecular Cell* 26 (2): 231–43.
- Iyer, Lakshminarayan M, Detlef D Leipe, Eugene V Koonin, and L Aravind. 2004. "Evolutionary History and Higher Order Classification of AAA+ ATPases." *Journal of Structural Biology* 146 (1–2): 11–31.
- Jäkel, S. et al. 1999. "The Importin Beta/importin 7 Heterodimer Is a Functional Nuclear Import Receptor for Histone H1." *The EMBO Journal* 18(9):2411–23.
- Jeggo, Penelope, Belinda Singleton, Heather Beamish, and Anne Priestley. 1999. "Double Strand Break Rejoining by the Ku-Dependent Mechanism of Non-Homologous End-Joining." *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie* 322 (2–3): 109–12.
- Jeong, S.-Y., A. Kumagai, J. Lee, and W. G. Dunphy. 2003. "Phosphorylated Claspin Interacts with a Phosphate-Binding Site in the Kinase Domain of Chk1 during ATR-Mediated Activation." *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46782–88.
- Jeong, Seong-Yun, Akiko Kumagai, Joon Lee, and William G Dunphy. 2003. "Phosphorylated Claspin Interacts with a Phosphate-Binding Site in the Kinase Domain of Chk1 during ATR-Mediated Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46782–88.
- Jovanovic, Marko, and William S Dynan. 2006. "Terminal DNA Structure and ATP Influence Binding Parameters of the DNA-Dependent Protein Kinase at an Early Step prior to DNA Synapsis." *Nucleic Acids Research* 34 (4): 1112–20.
- Jungmichel, Stephanie, Julie A Clapperton, Janette Lloyd, Flurina J Hari, Christoph Spycher, Lucijana Pavic, Jiejun Li, et al. 2012. "The Molecular Basis of ATM-Dependent Dimerization of the Mdc1 DNA Damage Checkpoint Mediator." *Nucleic Acids Research* 40 (9). Oxford University Press: 3913–28.
- Kadyrov, Farid A., Leonid Dzantiev, Nicoleta Constantin, and Paul Modrich. 2006. "Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair." *Cell* 126 (2): 297–

- Kaplan, Daniel L, Megan J Davey, and Mike O'Donnell. 2003. "Mcm4,6,7 Uses a "pump in Ring" Mechanism to Unwind DNA by Steric Exclusion and Actively Translocate along a Duplex." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 49171–82.
- Karanam, Ketki, Ran Kafri, Alexander Loewer, and Galit Lahav. 2012. "Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase." *Molecular Cell* 47 (2): 320–29.
- Kari, Vijayalakshmi, Wael Yassin Mansour, Sanjay Kumar Raul, Simon J Baumgart, Andreas Mund, Marian Grade, Hüseyin Sirma, et al. 2016. "Loss of CHD1 Causes DNA Repair Defects and Enhances Prostate Cancer Therapeutic Responsiveness." *EMBO Reports* 17 (11): 1609–23.
- Karimi-Busheri, F., A. Rasouli-Nia, J. Allalunis-Turner, and M. Weinfeld. 2007. "Human Polynucleotide Kinase Participates in Repair of DNA Double-Strand Breaks by Nonhomologous End Joining but Not Homologous Recombination." *Cancer Research* 67 (14): 6619–25.
- Karmakar, Parimal, Jason Piotrowski, Robert M Brosh, Joshua A Sommers, Susan P Lees Miller, Wen-Hsing Cheng, Carey M Snowden, Dale A Ramsden, and Vilhelm A Bohr. 2002. "Werner Protein Is a Target of DNA-Dependent Protein Kinase in Vivo and in Vitro, and Its Catalytic Activities Are Regulated by Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18291–302.
- Karmakar, Parimal, Masayuki Seki, Makoto Kanamori, Kazunari Hashiguchi, Makoto Ohtsuki, Eriko Murata, Eri Inoue, et al. 2006. "BLM Is an Early Responder to DNA Double-Strand Breaks." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (1): 62–69.
- Kastan, M B, and D S Lim. 2000. "The Many Substrates and Functions of ATM." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (3): 179–86.
- Keka, Islam Shamima, Mohiuddin, Yuko Maede, Md Maminur Rahman, Tetsushi Sakuma, Masamitsu Honma, Takashi Yamamoto, Shunichi Takeda, and Hiroyuki Sasanuma. 2015. "Smarcal1 Promotes Double-Strand-Break Repair by Nonhomologous End-

- Joining." *Nucleic Acids Research* 43 (13): 6359–72.
- Kim, J. M., Kazuki Nakao, Kenji Nakamura, Izumu Saito, Motoya Katsuki, Ken-ichi Arai, and Hisao Masai. 2002. "Inactivation of Cdc7 Kinase in Mouse ES Cells Results in S-Phase Arrest and p53-Dependent Cell Death." *The EMBO Journal* 21 (9): 2168–79.
- Kim, S T, D S Lim, C E Canman, and M B Kastan. 1999. "Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 37538–43.
- Kimura, H, T Ohtomo, M Yamaguchi, A Ishii, and K Sugimoto. 1996. "Mouse MCM Proteins: Complex Formation and Transportation to the Nucleus." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 1 (11): 977–93.
- Kinoshita, Eri, Sari van Rossum-Fikkert, Humberto Sanchez, Aryandi Kertokalio, and Claire Wyman. 2015. "Human RAD50 Makes a Functional DNA-Binding Complex." *Biochimie* 113 (June): 47–53.
- Kleczkowska, H E, G Marra, T Lettieri, and J Jiricny. 2001. "hMSH3 and hMSH6 Interact with PCNA and Colocalize with It to Replication Foci." *Genes & Development* 15 (6): 724–36.
- Klungland, A, and T Lindahl. 1997. "Second Pathway for Completion of Human DNA Base Excision-Repair: Reconstitution with Purified Proteins and Requirement for DNase IV (FEN1)." *The EMBO Journal* 16 (11): 3341–48.
- Kobayashi, Junya, Hiroshi Tauchi, Shuichi Sakamoto, Asako Nakamura, Ken-ichi Morishima, Shinya Matsuura, Toshiko Kobayashi, Katsuyuki Tamai, Keiji Tanimoto, and Kenshi Komatsu. 2002. "NBS1 Localizes to Gamma-H2AX Foci through Interaction with the FHA/BRCT Domain." *Current Biology : CB* 12 (21): 1846–51.
- Koonin, E V. 1993. "A Common Set of Conserved Motifs in a Vast Variety of Putative Nucleic Acid-Dependent ATPases Including MCM Proteins Involved in the Initiation of Eukaryotic DNA Replication." *Nucleic Acids Research* 21 (11): 2541–47.
- Korwek, Z., T. Sewastianik, A. Bielak-Zmijewska, G. Mosieniak, O. Alster, M. Moreno-Villaneuva, A. Burkle, E. Sikora, and E Sikora. 2012. "Inhibition of ATM Blocks the Etoposide-Induced DNA Damage Response and Apoptosis of Resting Human T Cells."

DNA Repair 11 (11): 864–73.

- Krude, T, C Musahl, R A Laskey, and R Knippers. 1996. "Human Replication Proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 Bind Chromatin Uniformly before S-Phase and Are Displaced Locally during DNA Replication." *Journal of Cell Science*, February, 309–18.
- Kruhlak, Michael J, Arkady Celeste, Graham Dellaire, Oscar Fernandez-Capetillo, Waltraud G Müller, James G McNally, David P Bazett-Jones, and André Nussenzweig. 2006. "Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Cell Biology* 172 (6): 823–34.
- Kubota, Y, R A Nash, A Klungland, P Schär, D E Barnes, and T Lindahl. 1996. "Reconstitution of DNA Base Excision-Repair with Purified Human Proteins: Interaction between DNA Polymerase Beta and the XRCC1 Protein." *The EMBO Journal* 15 (23): 6662–70.
- Kulartz, Monika, Ekkehard Hiller, Ferdinand Kappes, Lorenzo A Pinna, and Rolf Knippers. 2004. "Protein Kinase CK2 Phosphorylates the Cell Cycle Regulatory Protein Geminin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315 (4): 1011–17.
- Kumagai, Akiko, and William G Dunphy. 2003a. "Repeated Phosphopeptide Motifs in Claspin Mediate the Regulated Binding of Chk1." *Nature Cell Biology* 5 (2): 161–65.
- Kumagai, Akiko, and William G. Dunphy. 2003b. "Repeated Phosphopeptide Motifs in Claspin Mediate the Regulated Binding of Chk1." *Nature Cell Biology* 5 (2). Nature Publishing Group: 161–65.
- Kumagai, Akiko, Joon Lee, Hae Yong Yoo, and William G. Dunphy. 2006. "TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex." *Cell* 124 (5): 943–55.
- Laat, W L de, E Appeldoorn, K Sugasawa, E Weterings, N G Jaspers, and J H Hoeijmakers. 1998. "DNA-Binding Polarity of Human Replication Protein A Positions Nucleases in Nucleotide Excision Repair." *Genes & Development* 12 (16). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2598–2609.
- Labib, K, J A Tercero, and J F Diffley. 2000. "Uninterrupted MCM2-7 Function Required for DNA Replication Fork Progression." *Science (New York, N.Y.)* 288 (5471): 1643–47.
- Lam, Stephanie S, Jeffrey D Martell, Kimberli J Kamer, Thomas J Deerinck, Mark H Ellisman, Vamsi K Mootha, and Alice Y Ting. 2015. "Directed Evolution of APEX2 for Electron

- Microscopy and Proximity Labeling.” *Nature Methods* 12 (1). NIH Public Access: 51–54.
- Lan, L., Satoshi Nakajima, Kenshi Komatsu, Andre Nussenzweig, Akira Shimamoto, Junko Oshima, and Akira Yasui. 2005. “Accumulation of Werner Protein at DNA Double-Strand Breaks in Human Cells.” *Journal of Cell Science* 118 (18): 4153–62.
- Lau, Patrick J, and Richard D Kolodner. 2003. “Transfer of the MSH2.MSH6 Complex from Proliferating Cell Nuclear Antigen to Mismatched Bases in DNA.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (1): 14–17.
- Lee, Eva Y.-H. P., Song Zhao, Yi-Chinn Weng, Shyng-Shiou F. Yuan, Yi-Tzu Lin, Hao-Chi Hsu, Suh-Chin J. Lin, et al. 2000. “Functional Link between Ataxia-Telangiectasia and Nijmegen Breakage Syndrome Gene Products.” *Nature* 405 (6785): 473–77.
- Lee, Han-Sae, Ji-Hye Park, So-Jung Kim, Su-Jung Kwon, and Jongbum Kwon. 2010. “A Cooperative Activation Loop among SWI/SNF, Gamma-H2AX and H3 Acetylation for DNA Double-Strand Break Repair.” *The EMBO Journal* 29 (8): 1434–45.
- Lee, J.-H., and Tanya T Paull. 2005. “ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex.” *Science* 308 (5721): 551–54.
- Lee, J K, and J Hurwitz. 2000. “Isolation and Characterization of Various Complexes of the Minichromosome Maintenance Proteins of *Schizosaccharomyces Pombe*.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 18871–78.
- Lee, J K, and J Hurwitz. 2001. “Processive DNA Helicase Activity of the Minichromosome Maintenance Proteins 4, 6, and 7 Complex Requires Forked DNA Structures.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1): 54–59.
- Lee, Jong-Soo, Kimberly M. Collins, Alexandra L. Brown, Chang-Hun Lee, and Jay H. Chung. 2000. “hCds1-Mediated Phosphorylation of BRCA1 Regulates the DNA Damage Response.” *Nature* 404 (6774): 201–4.
- Lee, Kyung-Jong, Marko Jovanovic, Durga Udayakumar, Catherine L. Bladen, and William S. Dynan. 2004. “Identification of DNA-PKcs Phosphorylation Sites in XRCC4 and Effects of Mutations at These Sites on DNA End Joining in a Cell-Free System.” *DNA Repair* 3

(3): 267–76.

- Lee, Kyung Yong, Jun-Sub Im, Etsuko Shibata, Jonghoon Park, Naofumi Handa, Stephen C Kowalczykowski, and Anindya Dutta. 2015. "MCM8-9 Complex Promotes Resection of Double-Strand Break Ends by MRE11-RAD50-NBS1 Complex." *Nature Communications* 6 (July): 7744.
- Lee, Y Y, Y B Yu, H P Gunawardena, L Xie, and X Chen. 2012. "BCLAF1 Is a Radiation-Induced H2AX-Interacting Partner Involved in γ H2AX-Mediated Regulation of Apoptosis and DNA Repair." *Cell Death and Disease* 3 (7): e359.
- Lei, M, Y Kawasaki, and B K Tye. 1996. "Physical Interactions among Mcm Proteins and Effects of Mcm Dosage on DNA Replication in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 5081–90.
- Leonardo, A Di, S P Linke, K Clarkin, and G M Wahl. 1994. "DNA Damage Triggers a Prolonged p53-Dependent G1 Arrest and Long-Term Induction of Cip1 in Normal Human Fibroblasts." *Genes & Development* 8 (21): 2540–51.
- Li, Baomin, and Lucio Comai. 2002. "Displacement of DNA-PKcs from DNA Ends by the Werner Syndrome Protein." *Nucleic Acids Research* 30 (17): 3653–61.
- Li, G M, and P Modrich. 1995. "Restoration of Mismatch Repair to Nuclear Extracts of H6 Colorectal Tumor Cells by a Heterodimer of Human MutL Homologs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6): 1950–54.
- Li, J., and D. F. Stern. 2005. "Regulation of CHK2 by DNA-Dependent Protein Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 12041–50.
- Liao, S., C. Guay, T. Toczylowski, and H. Yan. 2012. "Analysis of MRE11's Function in the 5'->3' Processing of DNA Double-Strand Breaks." *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4496–4506.
- Liku, M. E., Van Q Nguyen, Audrey W Rosales, Kaoru Irie, and Joachim J Li. 2005. "CDK Phosphorylation of a Novel NLS-NES Module Distributed between Two Subunits of the Mcm2-7 Complex Prevents Chromosomal Rereplication." *Molecular Biology of the Cell* 16 (10): 5026–39.
- Lindahl, T. 1974. "An N-Glycosidase from *Escherichia Coli* That Releases Free Uracil from

- DNA Containing Deaminated Cytosine Residues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9): 3649–53.
- Lindahl, Tomas. 1993. "Instability and Decay of the Primary Structure of DNA." *Nature* 362 (6422): 709–15.
- Lord, Christopher J., and Alan Ashworth. 2012. "The DNA Damage Response and Cancer Therapy." *Nature* 481 (7381): 287–94.
- Lou, Zhenkun, Katherine Minter-Dykhouse, Sonia Franco, Monica Gostissa, Melissa A Rivera, Arkady Celeste, John P Manis, et al. 2006. "MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals." *Molecular Cell* 21 (2): 187–200.
- Lou, Zhenkun, Katherine Minter-Dykhouse, Xianglin Wu, and Junjie Chen. 2003. "MDC1 Is Coupled to Activated CHK2 in Mammalian DNA Damage Response Pathways." *Nature* 421 (6926): 957–61.
- Lu, Chengrong, Ying Shi, Zhe Wang, Zhihong Song, Meicai Zhu, Qing Cai, and Tao Chen. 2008. "Serum Starvation Induces H2AX Phosphorylation to Regulate Apoptosis via p38 MAPK Pathway." *FEBS Letters* 582 (18): 2703–8.
- Luijsterburg, Martijn S., Inge DeKrijger, Wouter W. Wiegant, Rashmi G. Shah, Godelieve Smeenk, Anton J.L. De Groot, Alex Pines, et al. 2016. "PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-Homologous End-Joining." *Molecular Cell* 61 (4): 547–62.
- Lukas, Claudia, Jacob Falck, Jirina Bartkova, Jiri Bartek, and Jiri Lukas. 2003. "Distinct Spatiotemporal Dynamics of Mammalian Checkpoint Regulators Induced by DNA Damage." *Nature Cell Biology* 5 (3). Nature Publishing Group: 255–60.
- Lygerou, Zoi, Hideo Nishitani, Takeharu Nishimoto, and Paul Nurse. 2000. "The Cdt1 Protein Is Required to License DNA for Replication in Fission Yeast." *Nature* 404 (6778): 625–28.
- Ma, Y., U. Pannicke, H. Lu, D. Niewolik, K. Schwarz, and M. R. Lieber. 2005. "The DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Phosphorylation Sites in Human Artemis." *Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33839–46.

- Ma, Yunmei, Ulrich Pannicke, Klaus Schwarz, and Michael R. Lieber. 2002. "Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination." *Cell* 108 (6): 781–94.
- Machida, Y. J., J. K. Teer, and A. Dutta. 2005. "Acute Reduction of an Origin Recognition Complex (ORC) Subunit in Human Cells Reveals a Requirement of ORC for Cdk2 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 27624–30.
- Mahaney, Brandi L., Katheryn Meek, and Susan P. Lees-Miller. 2009. "Repair of Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks by Non-Homologous End-Joining." *Biochemical Journal* 417 (3): 639–50. doi:10.1042/BJ20080413.
- Mahbubani, H M, J P Chong, S Chevalier, P Thömmes, and J J Blow. 1997. "Cell Cycle Regulation of the Replication Licensing System: Involvement of a Cdk-Dependent Inhibitor." *The Journal of Cell Biology* 136 (1): 125–35.
- Manke, Isaac A, Drew M Lowery, Anhco Nguyen, and Michael B Yaffe. 2003. "BRCT Repeats as Phosphopeptide-Binding Modules Involved in Protein Targeting." *Science* 302 (5645): 636–39.
- Marotti, Louis A, Rick Newitt, Yuqi Wang, Ruedi Aebersold, and Henrik G Dohlman. 2002. "Direct Identification of a G Protein Ubiquitination Site by Mass Spectrometry." *Biochemistry* 41 (16): 5067–74.
- Masutani, C, K Sugawara, J Yanagisawa, T Sonoyama, M Ui, T Enomoto, K Takio, et al. 1994. "Purification and Cloning of a Nucleotide Excision Repair Complex Involving the Xeroderma Pigmentosum Group C Protein and a Human Homologue of Yeast RAD23." *The EMBO Journal* 13 (8). European Molecular Biology Organization: 1831–43.
- Mateos-Gomez, Pedro A., Fade Gong, Nidhi Nair, Kyle M. Miller, Eros Lazzerini-Denchi, and Agnel Sfeir. 2015. "Mammalian Polymerase θ Promotes Alternative NHEJ and Suppresses Recombination." *Nature* 518 (7538): 254–57.
- Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai, and S. J. Elledge. 2000. "Ataxia Telangiectasia-Mutated Phosphorylates Chk2 in Vivo and in Vitro." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences* 97 (19): 10389–94.
- McGarry, T J, and M W Kirschner. 1998. “Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis.” *Cell* 93 (6): 1043–53.
- Meek, Katheryn, Van Dang, and Susan P Lees-Miller. 2008. “DNA-PK: The Means to Justify the Ends?” *Advances in Immunology* 99: 33–58.
- Mello, J. A., Herman H W Silljé, Daniele M J Roche, Doris B Kirschner, Erich A Nigg, and Geneviève Almouzni. 2002. “Human Asf1 and CAF-1 Interact and Synergize in a Repair-Coupled Nucleosome Assembly Pathway.” *EMBO Reports* 3 (4): 329–34.
- Miller, Kyle M, Jorrit V Tjeertes, Julia Coates, Ga?lle Legube, Sophie E Polo, S?bastien Britton, and Stephen P Jackson. 2010. “Human HDAC1 and HDAC2 Function in the DNA-Damage Response to Promote DNA Nonhomologous End-Joining.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (99): 1144–51.
- Mimori, T, J A Hardin, and J A Steitz. 1986. “Characterization of the DNA-Binding Protein Antigen Ku Recognized by Autoantibodies from Patients with Rheumatic Disorders.” *The Journal of Biological Chemistry* 261 (5): 2274–78.
- Min, Sunwoo, Sujin Jo, Ho-Soo Lee, Sunyoung Chae, Jong-Soo Lee, Jae-Hoon Ji, and Hyeseong Cho. 2014. “ATM-Dependent Chromatin Remodeler Rsf-1 Facilitates DNA Damage Checkpoints and Homologous Recombination Repair.” *Cell Cycle* 13 (4): 666–77.
- Montecucco, Alessandra, and Giuseppe Biamonti. 2007. “Cellular Response to Etoposide Treatment.” *Cancer Letters* 252 (1): 9–18.
- Mordes, Daniel A, Gloria G Glick, Runxiang Zhao, and David Cortez. 2008. “TopBP1 Activates ATR through ATRIP and a PIKK Regulatory Domain.” *Genes & Development* 22 (11). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1478–89.
- Moser, Jill, Hanneke Kool, Ioannis Giakzidis, Keith Caldecott, Leon H.F. Mullenders, and Maria I. Foustieri. 2007. “Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III α in a Cell-Cycle-Specific Manner.” *Molecular Cell* 27 (2): 311–23.
- Moynahan, M E, A J Pierce, and M Jasin. 2001. “BRCA2 Is Required for Homology-Directed

- Repair of Chromosomal Breaks.” *Molecular Cell* 7 (2): 263–72.
- Murga, Matilde, Isabel Jaco, Yuhong Fan, Rebeca Soria, Barbara Martinez-Pastor, Myriam Cuadrado, Seung-Min Yang, Maria A Blasco, Arthur I Skoultchi, and Oscar Fernandez-Capetillo. 2007. “Global Chromatin Compaction Limits the Strength of the DNA Damage Response.” *The Journal of Cell Biology* 178 (7): 1101–8.
- Murr, Rabih, Joanna I Loizou, Yun-Gui Yang, Cyrille Cuenin, Hai Li, Zhao-Qi Wang, and Zdenko Herceg. 2006. “Histone Acetylation by Trrap-Tip60 Modulates Loading of Repair Proteins and Repair of DNA Double-Strand Breaks.” *Nature Cell Biology* 8 (1): 91–99.
- Nakamura, Kyosuke, Akihiro Kato, Junya Kobayashi, Hiromi Yanagihara, Shuichi Sakamoto, Douglas V N P Oliveira, Mikio Shimada, et al. 2011. “Regulation of Homologous Recombination by RNF20-Dependent H2B Ubiquitination.” *Molecular Cell* 41 (5): 515–28.
- Nance, Martha A., and Susan A. Berry. 1992. “Cockayne Syndrome: Review of 140 Cases.” *American Journal of Medical Genetics* 42 (1): 68–84.
- Natsume, Ryo, Masamitsu Eitoku, Yusuke Akai, Norihiko Sano, Masami Horikoshi, and Toshiya Senda. 2007. “Structure and Function of the Histone Chaperone CIA/ASF1 Complexed with Histones H3 and H4.” *Nature* 446 (7133): 338–41.
- Neal, J. A., V. Dang, P. Douglas, M. S. Wold, S. P. Lees-Miller, and K. Meek. 2011. “Inhibition of Homologous Recombination by DNA-Dependent Protein Kinase Requires Kinase Activity, Is Titratable, and Is Modulated by Autophosphorylation.” *Molecular and Cellular Biology* 31 (8): 1719–33.
- Neal, Jessica A., and Katheryn Meek. 2011. “Choosing the Right Path: Does DNA-PK Help Make the Decision?” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711 (1–2): 73–86.
- Nguyen, Tin, Madhav Jagannathan, Kathy Shire, Lori Frappier, and N Sivachandran. 2012. “Interactions of the Human MCM-BP Protein with MCM Complex Components and Dbf4.” Edited by Sue Cotterill. *PLoS ONE* 7 (4). Public Library of Science: e35931.
- Nick McElhinny, S A, C M Snowden, J McCarville, and D A Ramsden. 2000. “Ku Recruits the

- XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends." *Molecular and Cellular Biology* 20 (9). American Society for Microbiology (ASM): 2996–3003.
- Nielsen, Finn Cilius, Anne Charlotte Jäger, Anne Lützen, Jens R Bundgaard, and Lene Juel Rasmussen. 2004. "Characterization of Human Exonuclease 1 in Complex with Mismatch Repair Proteins, Subcellular Localization and Association with PCNA." *Oncogene* 23 (7): 1457–68.
- Niida, H., Y. Katsuno, B. Banerjee, M. P. Hande, and M. Nakanishi. 2007. "Specific Role of Chk1 Phosphorylations in Cell Survival and Checkpoint Activation." *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2572–81.
- Nimonkar, A. V., J. Genschel, E. Kinoshita, P. Polaczek, J. L. Campbell, C. Wyman, P. Modrich, and S. C. Kowalczykowski. 2011. "BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair." *Genes & Development* 25 (4): 350–62.
- Nimonkar, Amitabh V, A Zeynep Ozsoy, Jochen Genschel, Paul Modrich, and Stephen C Kowalczykowski. 2008. "Human Exonuclease 1 and BLM Helicase Interact to Resect DNA and Initiate DNA Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44): 16906–11.
- Nishi, Ryotaro, Yuki Okuda, Eriko Watanabe, Toshio Mori, Shigenori Iwai, Chikahide Masutani, Kaoru Sugawara, and Fumio Hanaoka. 2005. "Centrin 2 Stimulates Nucleotide Excision Repair by Interacting with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein." *Molecular and Cellular Biology* 25 (13). American Society for Microbiology (ASM): 5664–74.
- Norbury, Chris J, and Boris Zhivotovsky. 2004. "DNA Damage-Induced Apoptosis." *Oncogene* 23 (16): 2797–2808.
- Nurse, Paul. 1990. "Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase." *Nature* 344 (6266): 503–8.
- O'Neill, T, A J Dwyer, Y Ziv, D W Chan, S P Lees-Miller, R H Abraham, J H Lai, et al. 2000. "Utilization of Oriented Peptide Libraries to Identify Substrate Motifs Selected by ATM." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (30): 22719–27.

- Oakley, Gregory G., Steve M. Patrick, Jiaqin Yao, Michael P. Carty, John J. Turchi, and Kathleen Dixon. 2003. "RPA Phosphorylation in Mitosis Alters DNA Binding and Protein-Protein Interactions ?" *Biochemistry* 42 (11): 3255–64.
- Obe, G, C Johannes, and D Schulte-Frohlinde. 1992. "DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely Ionizing Radiation and Endonucleases as Critical Lesions for Cell Death, Chromosomal Aberrations, Mutations and Oncogenic Transformation." *Mutagenesis* 7 (1): 3–12.
- Ogi, Tomoo, Siripan Limsirichaikul, René M. Overmeer, Marcel Volker, Katsuya Takenaka, Ross Cloney, Yuka Nakazawa, et al. 2010. "Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells." *Molecular Cell* 37 (5): 714–27.
- Ogiwara, H, A Ui, A Otsuka, H Satoh, I Yokomi, S Nakajima, A Yasui, J Yokota, and T Kohno. 2011. "Histone Acetylation by CBP and p300 at Double-Strand Break Sites Facilitates SWI/SNF Chromatin Remodeling and the Recruitment of Non-Homologous End Joining Factors." *Oncogene* 30 (18): 2135–46.
- Ong, Shao-En, Blagoy Blagoev, Irina Kratchmarova, Dan Bach Kristensen, Hanno Steen, Akhilesh Pandey, and Matthias Mann. 2002. "Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 1 (5): 376–86.
- Ong, Shao-En, Leonard J Foster, and Matthias Mann. 2003. "Mass Spectrometric-Based Approaches in Quantitative Proteomics." *Methods (San Diego, Calif.)* 29 (2): 124–30.
- Orelli, B., T. B. McClendon, O. V. Tsodikov, T. Ellenberger, L. J. Niedernhofer, and O. D. Scharer. 2010. "The XPA-Binding Domain of ERCC1 Is Required for Nucleotide Excision Repair but Not Other DNA Repair Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 285 (6): 3705–12.
- Otsuki, Makoto, Masayuki Seki, Yoh-ichi Kawabe, Eri Inoue, Yu Peng Dong, Takuya Abe, Genta Kato, Akari Yoshimura, Shusuke Tada, and Takemi Enomoto. 2007. "WRN Counteracts the NHEJ Pathway upon Camptothecin Exposure." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355 (2): 477–82.

- Ouyang, Karen J, Leslie L Woo, and Nathan A Ellis. 2008. "Homologous Recombination and Maintenance of Genome Integrity: Cancer and Aging through the Prism of Human RecQ Helicases." *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (7–8): 425–40.
- Pacek, Marcin, and Johannes C Walter. 2004. "A Requirement for MCM7 and Cdc45 in Chromosome Unwinding during Eukaryotic DNA Replication." *The EMBO Journal* 23 (18): 3667–76.
- Paul, Katja, Minli Wang, Emil Mladenov, Alena Bencsik-Theilen, Theresa Bednar, Wenqi Wu, Hiroshi Arakawa, and George Iliakis. 2013. "DNA Ligases I and III Cooperate in Alternative Non-Homologous End-Joining in Vertebrates." Edited by Arthur J. Lustig. *PloS One* 8 (3): e59505.
- Paull, T. T., D. Cortez, B. Bowers, S. J. Elledge, and M. Gellert. 2001. "Direct DNA Binding by Brca1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (11): 6086–91.
- Paull, T T, and M Gellert. 1998. "The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre 11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Molecular Cell* 1 (7): 969–79.
- Paull, T T, and M Gellert. 1999. "Nbs1 Potentiates ATP-Driven DNA Unwinding and Endonuclease Cleavage by the Mre11/Rad50 Complex." *Genes & Development* 13 (10): 1276–88.
- Paull, T T, E P Rogakou, V Yamazaki, C U Kirchgessner, M Gellert, and W M Bonner. 2000. "A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci after DNA Damage." *Current Biology : CB* 10 (15): 886–95.
- Pedrazzi, Graziella, Csanád Z Bachrati, Nives Selak, Ingrid Studer, Maja Petkovic, Ian D Hickson, Josef Jiricny, and Igor Stagljar. 2003. "The Bloom's Syndrome Helicase Interacts Directly with the Human DNA Mismatch Repair Protein hMSH6." *Biological Chemistry* 384 (8): 1155–64.
- Peng, Cheng-Yuan, Paul R. Graves, Richard S. Thoma, Zhiqi Wu, Andrey S. Shaw, and Helen Piwnicka-Worms. 1997. "Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216." *Science* 277 (5331).
- Peng, Guang, Eun-Kyoung Yim, Hui Dai, Andrew P Jackson, Ineke van der Burgt, Mei-Ren Pan, Ruozhen Hu, Kaiyi Li, and Shiaw-Yih Lin. 2009. "BRIT1/MCPH1 Links Chromatin

- Remodelling to DNA Damage Response.” *Nature Cell Biology* 11 (7): 865–72.
- Perrault, R., Nge Cheong, Huichen Wang, Hongyan Wang, and G. Iliakis. 2001. “RPA Facilitates Rejoining of DNA Double-Strand Breaks in an in Vitro Assay Utilizing Genomic DNA as Substrate.” *International Journal of Radiation Biology* 77 (5): 593–607.
- Petermann, Eva, Mathias Ziegler, and Shiao Li Oei. 2003. “ATP-Dependent Selection between Single Nucleotide and Long Patch Base Excision Repair.” *DNA Repair* 2 (10): 1101–14.
- Pilyugin, Maxim, Jeroen Demmers, C. Peter Verrijzer, Francois Karch, and Yuri M. Moshkin. 2009. “Phosphorylation-Mediated Control of Histone Chaperone ASF1 Levels by Tousled-Like Kinases.” Edited by Joanna Mary Bridger. *PLoS ONE* 4 (12): e8328.
- Postow, L., E. M. Woo, B. T. Chait, and H. Funabiki. 2009. “Identification of SMARCAL1 as a Component of the DNA Damage Response.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (51): 35951–61.
- Potts, Patrick Ryan, Matthew H Porteus, and Hongtao Yu. 2006. “Human SMC5/6 Complex Promotes Sister Chromatid Homologous Recombination by Recruiting the SMC1/3 Cohesin Complex to Double-Strand Breaks.” *The EMBO Journal* 25 (14): 3377–88.
- Prolla, T A, D M Christie, and R M Liskay. 1994. “Dual Requirement in Yeast DNA Mismatch Repair for MLH1 and PMS1, Two Homologs of the Bacterial mutL Gene.” *Molecular and Cellular Biology* 14 (1): 407–15.
- Ramilo, Cecilia, Liya Gu, Shuangli Guo, Xiping Zhang, Steve M Patrick, John J Turchi, and Guo-Min Li. 2002. “Partial Reconstitution of Human DNA Mismatch Repair in Vitro: Characterization of the Role of Human Replication Protein A.” *Molecular and Cellular Biology* 22 (7): 2037–46.
- Ramsden, Dale A. 2011. “Polymerases in Nonhomologous End Joining: Building a Bridge over Broken Chromosomes.” *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (12): 2509–19.
- Ranalli, T. A., S. Tom, and R. A. Bambara. 2002. “AP Endonuclease 1 Coordinates Flap Endonuclease 1 and DNA Ligase I Activity in Long Patch Base Excision Repair.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41715–24.

- Ray, Alo, Keisha Milum, Aruna Battu, Gulzar Wani, and Altaf A. Wani. 2013. "NER Initiation Factors, DDB2 and XPC, Regulate UV Radiation Response by Recruiting ATR and ATM Kinases to DNA Damage Sites." *DNA Repair* 12 (4): 273–83.
- Riedl, T., Fumio Hanaoka, and Jean-Marc Egly. 2003. "The Comings and Goings of Nucleotide Excision Repair Factors on Damaged DNA." *The EMBO Journal* 22 (19): 5293–5303.
- Ritzi, M, M Baack, C Musahl, P Romanowski, R A Laskey, and R Knippers. 1998. "Human Minichromosome Maintenance Proteins and Human Origin Recognition Complex 2 Protein on Chromatin." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (38): 24543–49.
- Rivera-Calzada, Angel, Laura Spagnolo, Laurence H Pearl, and Oscar Llorca. 2007. "Structural Model of Full-Length Human Ku70-Ku80 Heterodimer and Its Recognition of DNA and DNA-PKcs." *EMBO Reports* 8 (1): 56–62.
- Robert, F., S. Hardy, Z. Nagy, C. Baldeyron, R. Murr, U. Dery, J.-Y. Masson, D. Papadopoulou, Z. Herceg, and L. Tora. 2006. "The Transcriptional Histone Acetyltransferase Cofactor TRRAP Associates with the MRN Repair Complex and Plays a Role in DNA Double-Strand Break Repair." *Molecular and Cellular Biology* 26 (2): 402–12.
- Roffers-Agarwal, Julaine, Karla J. Hutt, and Laura S. Gammill. 2012. "Paladin Is an Antiphosphatase That Regulates Neural Crest Cell Formation and Migration." *Developmental Biology* 371(2):180–90.
- Rogakou, E P, C Boon, C Redon, and W M Bonner. 1999. "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo." *The Journal of Cell Biology* 146 (5): 905–16.
- Rogakou, E P, D R Pilch, A H Orr, V S Ivanova, and W M Bonner. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68.
- Rothkamm, Kai, Ines Krüger, Larry H Thompson, and Markus Löbrich. 2003. "Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle." *Molecular and Cellular Biology* 23 (16). American Society for Microbiology (ASM): 5706–15.
- Sakwe, A. M., T. Nguyen, V. Athanasopoulos, K. Shire, and L. Frappier. 2007. "Identification

- and Characterization of a Novel Component of the Human Minichromosome Maintenance Complex." *Molecular and Cellular Biology* 27 (8): 3044–55.
- Sánchez-Molina, Sara, Oliver Mortusewicz, Béatrice Bieber, Susanne Auer, Maren Eckey, Heinrich Leonhardt, Anna A Friedl, and Peter B Becker. 2011. "Role for hACF1 in the G2/M Damage Checkpoint." *Nucleic Acids Research* 39 (19): 8445–56.
- Sanchez, Y, C Wong, R S Thoma, R Richman, Z Wu, H Piwnica-Worms, and S J Elledge. 1997. "Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation through Cdc25." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5331): 1497–1501.
- Sato, M, T Gotow, Z You, Y Komamura-Kohno, Y Uchiyama, N Yabuta, H Nojima, and Y Ishimi. 2000. "Electron Microscopic Observation and Single-Stranded DNA Binding Activity of the Mcm4,6,7 Complex." *Journal of Molecular Biology* 300 (3): 421–31.
- Savitsky, K, A Bar-Shira, S Gilad, G Rotman, Y Ziv, L Vanagaite, D A Tagle, et al. 1995. "A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase." *Science* 268 (5218): 1749–53.
- Schmutte, C, R C Marinescu, M M Sadoff, S Guerrette, J Overhauser, and R Fishel. 1998. "Human Exonuclease I Interacts with the Mismatch Repair Protein hMSH2." *Cancer Research* 58 (20): 4537–42.
- Schulz, L. L., and Jessica K Tyler. 2006. "The Histone Chaperone ASF1 Localizes to Active DNA Replication Forks to Mediate Efficient DNA Replication." *The FASEB Journal* 20 (3): 488–90.
- Schwacha, A, and S P Bell. 2001. "Interactions between Two Catalytically Distinct MCM Subgroups Are Essential for Coordinated ATP Hydrolysis and DNA Replication." *Molecular Cell* 8 (5): 1093–1104.
- Schwartz, J L, J Rotmensch, S Giovanazzi, M B Cohen, and R R Weichselbaum. 1988. "Faster Repair of DNA Double-Strand Breaks in Radioresistant Human Tumor Cells." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 15 (4): 907–12.
- Schwendener, Sybille, Steven Raynard, Shreya Paliwal, Anita Cheng, Radhakrishnan Kanagaraj, Igor Shevelev, Jeremy M Stark, Patrick Sung, and Pavel Janscak. 2010.

- “Physical Interaction of RECQ5 Helicase with RAD51 Facilitates Its Anti-Recombinase Activity.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 15739–45.
- Schwertman, Petra, Anna Lagarou, Dick H W Dekkers, Anja Raams, Adriana C van der Hoek, Charlie Laffeber, Jan H J Hoeijmakers, et al. 2012. “UV-Sensitive Syndrome Protein UVSSA Recruits USP7 to Regulate Transcription-Coupled Repair.” *Nature Genetics* 44 (5): 598–602.
- Scrima, Andrea, Renata Konícková, Bryan K Czyzewski, Yusuke Kawasaki, Philip D Jeffrey, Regina Groisman, Yoshihiro Nakatani, Shigenori Iwai, Nikola P Pavletich, and Nicolas H Thomä. 2008. “Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1-DDB2 Complex.” *Cell* 135 (7): 1213–23.
- Scully, R, J Chen, A Plug, Y Xiao, D Weaver, J Feunteun, T Ashley, and D M Livingston. 1997. “Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells.” *Cell* 88 (2): 265–75.
- Sharma, Sudha, and Robert M Brosh. 2007. “Human RECQ1 Is a DNA Damage Responsive Protein Required for Genotoxic Stress Resistance and Suppression of Sister Chromatid Exchanges.” Edited by Martin Marinus. *PloS One* 2 (12): e1297.
- Sharma, Sudha, Kevin M. Doherty, and Robert M. Brosh. 2006. “Mechanisms of RecQ Helicases in Pathways of DNA Metabolism and Maintenance of Genomic Stability.” *Biochemical Journal* 398 (3): 319–37.
- Shell, Scarlet S, Christopher D Putnam, and Richard D Kolodner. 2007. “The N Terminus of *Saccharomyces Cerevisiae* Msh6 Is an Unstructured Tether to PCNA.” *Molecular Cell* 26 (4): 565–78.
- Shenoy, T.R., G. Boysen, M.Y. Wang, Q.Z. Xu, W. Guo, F. M. Koh, C. Wang, et al. 2017. “CHD1 Loss Sensitizes Prostate Cancer to DNA Damaging Therapy by Promoting Error-Prone Double-Strand Break Repair.” *Annals of Oncology*, April.
- Sheu, Yi-Jun, and Bruce Stillman. 2006. “Cdc7-Dbf4 Phosphorylates MCM Proteins via a Docking Site-Mediated Mechanism to Promote S Phase Progression.” *Molecular Cell* 24 (1): 101–13.
- Shevchenko, A, M Wilm, O Vorm, and M Mann. 1996. “Mass Spectrometric Sequencing of Proteins Silver-Stained Polyacrylamide Gels.” *Analytical Chemistry* 68 (5): 850–58.

- Shibata, Atsushi, Davide Moiani, Andrew S Arvai, Jefferson Perry, Shane M Harding, Marie-Michelle Genois, Ranjan Maity, et al. 2014. "DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities." *Molecular Cell* 53 (1): 7–18.
- Shinohara, A, H Ogawa, and T Ogawa. 1992. "Rad51 Protein Involved in Repair and Recombination in *S. Cerevisiae* Is a RecA-like Protein." *Cell* 69 (3): 457–70.
- Shintani, Satoru, Mariko Mihara, Chunnan Li, Yuuji Nakahara, Satoshi Hino, Koh-Ichi Nakashiro, and Hiroyuki Hamakawa. 2003. "Up-Regulation of DNA-Dependent Protein Kinase Correlates with Radiation Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Cancer Science* 94 (10): 894–900.
- Shreeram, S, Alison Sparks, David P Lane, and J Julian Blow. 2002. "Cell Type-Specific Responses of Human Cells to Inhibition of Replication Licensing." *Oncogene* 21 (43): 6624–32.
- Shrivastav, Meena, Leyma P De Haro, and Jac A Nickoloff. 2008. "Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice." *Cell Research* 18 (1): 134–47.
- Simsek, Deniz, Erika Brunet, Sunnie Yan-Wai Wong, Sachin Katyal, Yankun Gao, Peter J McKinnon, Jacqueline Lou, et al. 2011. "DNA Ligase III Promotes Alternative Nonhomologous End-Joining during Chromosomal Translocation Formation." Edited by James E. Haber. *PLoS Genetics* 7 (6): e1002080.
- Singh, Dharmendra Kumar, Parimal Karmakar, Maria Aamann, Shepherd H. Schurman, Alfred May, Deborah L. Croteau, Lynnette Burks, Sharon E. Plon, and Vilhelm A. Bohr. 2010. "The Involvement of Human RECQL4 in DNA Double-Strand Break Repair." *Aging Cell* 9 (3): 358–71.
- Singhal, R K, and S H Wilson. 1993. "Short Gap-Filling Synthesis by DNA Polymerase Beta Is Processive." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (21): 15906–11.
- Smeenk, Godelieve, Wouter W. Wiegant, Hans Vrolijk, Aldo P. Solari, Albert Pastink, and Haico van Attikum. 2010. "The NuRD Chromatin-remodeling Complex Regulates Signaling and Repair of DNA Damage." *The Journal of Cell Biology* 190 (5): 741–49.
- Smits, Veronique A J, Philip M Reaper, and Stephen P Jackson. 2006. "Rapid PIKK-

- Dependent Release of Chk1 from Chromatin Promotes the DNA-Damage Checkpoint Response." *Current Biology : CB* 16 (2): 150–59.
- Sobol, Robert W., Julie K. Horton, Ralf Kühn, Hua Gu, Rakesh K. Singhal, Rajendra Prasad, Klaus Rajewsky, and Samuel H. Wilson. 1996. "Requirement of Mammalian DNA Polymerase- β in Base-Excision Repair." *Nature* 379 (6561): 183–86.
- Soniat, Michael, Tolga Cağatay, and Yuh Min Chook. 2016. "Recognition Elements in the Histone H3 and H4 Tails for Seven Different Importins." *Journal of Biological Chemistry* 291(40):21171–83.
- Staresincic, Lidija, Adebunke F Fagbemi, Jacqueline H Enzlin, Audrey M Gourdin, Nils Wijgers, Isabelle Dunand-Sauthier, Giuseppina Giglia-Mari, Stuart G Clarkson, Wim Vermeulen, and Orlando D Schärer. 2009. "Coordination of Dual Incision and Repair Synthesis in Human Nucleotide Excision Repair." *The EMBO Journal* 28 (8). European Molecular Biology Organization: 1111–20.
- Stewart, Grant S., Bin Wang, Colin R. Bignell, A. Malcolm R. Taylor, and Stephen J. Elledge. 2003. "MDC1 Is a Mediator of the Mammalian DNA Damage Checkpoint." *Nature* 421 (6926): 961–66.
- Stiff, Tom, Mark O'Driscoll, Nicole Rief, Kuniyoshi Iwabuchi, Markus Löbrich, and Penny A Jeggo. 2004. "ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation." *Cancer Research* 64 (7): 2390–96.
- Strande, Natasha, Steven A Roberts, Sehyun Oh, Eric A Hendrickson, and Dale A Ramsden. 2012. "Specificity of the dRP/AP Lyase of Ku Promotes Nonhomologous End Joining (NHEJ) Fidelity at Damaged Ends." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (17). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 13686–93.
- Stucki, Manuel, Julie A Clapperton, Duaa Mohammad, Michael B Yaffe, Stephen J Smerdon, and Stephen P Jackson. 2005. "MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks." *Cell* 123 (7): 1213–26.
- Sugasawa, K, J M Ng, C Masutani, S Iwai, P J van der Spek, A P Eker, F Hanaoka, D Bootsma, and J H Hoeijmakers. 1998. "Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is

- the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair.” *Molecular Cell* 2 (2): 223–32.
- Sugiyama, T., and Stephen C Kowalczykowski. 2002. “Rad52 Protein Associates with Replication Protein A (RPA)-Single-Stranded DNA to Accelerate Rad51-Mediated Displacement of RPA and Presynaptic Complex Formation.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31663–72.
- Sun, Jingchuan, Cecile Evrin, Stefan A Samel, Alejandra Fernández-Cid, Alberto Riera, Hironori Kawakami, Bruce Stillman, Christian Speck, and Huilin Li. 2013. “Cryo-EM Structure of a Helicase Loading Intermediate Containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 Bound to DNA.” *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (8): 944–51.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, and B. D. Price. 2005. “A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of ATM.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (37): 13182–87.
- Sun, Yingli, Ye Xu, Kanaklata Roy, and Brendan D Price. 2007. “DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity.” *Molecular and Cellular Biology* 27 (24): 8502–9.
- Sy, Shirley M. H., Michael S. Y. Huen, and Junjie Chen. 2009. “PALB2 Is an Integral Component of the BRCA Complex Required for Homologous Recombination Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(17):7155–60.
- Tada, S, A Li, D Maiorano, M Méchali, and J J Blow. 2001. “Repression of Origin Assembly in Metaphase Depends on Inhibition of RLF-B/Cdt1 by Geminin.” *Nature Cell Biology* 3 (2): 107–13.
- Takahashi, K, and I Kaneko. 1985. “Changes in Nuclease Sensitivity of Mammalian Cells after Irradiation with 60Co Gamma-Rays.” *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 48 (3): 389–95.
- Takata, M, M S Sasaki, E Sonoda, C Morrison, M Hashimoto, H Utsumi, Y Yamaguchi-Iwai, A Shinohara, and S Takeda. 1998. “Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in

- the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells.” *The EMBO Journal* 17 (18). European Molecular Biology Organization: 5497–5508.
- Tan, David S.P., Christian Rothermundt, Karen Thomas, Elizabeth Bancroft, Rosalind Eeles, Susan Shanley, Audrey Ardern-Jones, Andrew Norman, Stanley B. Kaye, and Martin E. Gore. 2008. “ "BRCAness" Syndrome in Ovarian Cancer: A Case-Control Study Describing the Clinical Features and Outcome of Patients With Epithelial Ovarian Cancer Associated With BRCA1 and BRCA2 Mutations.” *Journal of Clinical Oncology* 26 (34): 5530–36.
- Tanaka, T, D Knapp, and K Nasmyth. 1997. “Loading of an Mcm Protein onto DNA Replication Origins Is Regulated by Cdc6p and CDKs.” *Cell* 90 (4): 649–60.
- Tanaka, Toshiki, Xuan Huang, H Dorota Halicka, Hong Zhao, Frank Traganos, Anthony P Albino, Wei Dai, and Zbigniew Darzynkiewicz. 2007. “Cytometry of ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation to Estimate Extent of DNA Damage Induced by Exogenous Agents.” *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 71 (9): 648–61.
- Tanaka, Toshiki, M Kajstura, H D Halicka, F Traganos, and Z Darzynkiewicz. 2007. “Constitutive Histone H2AX Phosphorylation and ATM Activation Are Strongly Amplified during Mitogenic Stimulation of Lymphocytes.” *Cell Proliferation* 40 (1): 1–13.
- Tapias, Angels, Jerome Auriol, Diane Forget, Jacqueline H Enzlin, Orlando D Schärer, Frederic Coin, Benoit Coulombe, and Jean-Marc Egly. 2004. “Ordered Conformational Changes in Damaged DNA Induced by Nucleotide Excision Repair Factors.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (18). PMC Canada manuscript submission: 19074–83.
- Théard, Delphine, Marjorie Coisy, Bernard Ducommun, Patrick Concannon, and Jean-Marie Darbon. 2001. “Etoposide and Adriamycin but Not Genistein Can Activate the Checkpoint Kinase Chk2 Independently of ATM/ATR.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (5): 1199–1204.
- Tian, L., L. Gu, and G.-M. Li. 2009. “Distinct Nucleotide Binding/Hydrolysis Properties and

- Molar Ratio of MutS α and MutS β Determine Their Differential Mismatch Binding Activities." *Journal of Biological Chemistry* 284 (17): 11557–62.
- Tishkoff, D X, N S Amin, C S Viars, K C Arden, and R D Kolodner. 1998. "Identification of a Human Gene Encoding a Homologue of *Saccharomyces Cerevisiae* EXO1, an Exonuclease Implicated in Mismatch Repair and Recombination." *Cancer Research* 58 (22): 5027–31.
- Tishkoff, D X, A L Boerger, P Bertrand, N Filosi, G M Gaida, M F Kane, and R D Kolodner. 1997. "Identification and Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* EXO1, a Gene Encoding an Exonuclease That Interacts with MSH2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7487–92.
- Torres, Jorge Z., Julie J. Miller, and Peter K. Jackson. 2009a. "High-Throughput Generation of Tagged Stable Cell Lines for Proteomic Analysis." *Proteomics* 9 (10): 2888–91.
- Torres, Jorge Z, Julie J Miller, and Peter K Jackson. 2009b. "High-Throughput Generation of Tagged Stable Cell Lines for Proteomic Analysis." *Proteomics* 9 (10): 2888–91.
- Tran, Phuoc T, Naz Erdeniz, Lorraine S Symington, and R Michael Liskay. 2004. "EXO1-A Multi-Tasking Eukaryotic Nuclease." *DNA Repair* 3 (12): 1549–59.
- Traven, Ana, and Jörg Heierhorst. 2005a. "SQ/TQ Cluster Domains: Concentrated ATM/ATR Kinase Phosphorylation Site Regions in DNA-Damage-Response Proteins." *BioEssays* 27 (4): 397–407.
- Traven, Ana, and Jörg Heierhorst. 2005b. "SQ/TQ Cluster Domains: Concentrated ATM/ATR Kinase Phosphorylation Site Regions in DNA-Damage-Response Proteins." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27 (4): 397–407.
- Treszezamsky, A. D., L. A. Kachnic, Z. Feng, J. Zhang, C. Tokadjian, and S. N. Powell. 2007. "BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells Are Sensitive to Etoposide-Induced DNA Double-Strand Breaks via Topoisomerase II." *Cancer Research* 67 (15): 7078–81.
- Tsuji, Toshiya, Scott B Ficarro, and Wei Jiang. 2006. "Essential Role of Phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the Initiation of DNA Replication in Mammalian Cells." *Molecular Biology of the Cell* 17 (10). American Society for Cell Biology: 4459–72.

- Tye, Bik K. 1999a. "MCM Proteins in DNA Replication." *Annual Review of Biochemistry* 68 (1): 649–86.
- Tye, Bik K. 1999b. "Minichromosome Maintenance as a Genetic Assay for Defects in DNA Replication." *Methods* 18 (3): 329–34.
- Uematsu, Naoya, Eric Weterings, Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Burkhard Jakob, Gisela Taucher-Scholz, Pierre-Olivier Mari, Dik C. van Gent, Benjamin P.C. Chen, and David J. Chen. 2007. "Autophosphorylation of DNA-PK CS Regulates Its Dynamics at DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Cell Biology* 177 (2): 219–29.
- Umar, A, A B Buermeier, J A Simon, D C Thomas, A B Clark, R M Liskay, and T A Kunkel. 1996. "Requirement for PCNA in DNA Mismatch Repair at a Step Preceding DNA Resynthesis." *Cell* 87 (1): 65–73.
- Uziel, Tamar, Yaniv Lerenthal, Lilach Moyal, Yair Andegeko, Leonid Mittelman, and Yosef Shiloh. 2003. "Requirement of the MRN Complex for ATM Activation by DNA Damage." *The EMBO Journal* 22 (20). European Molecular Biology Organization: 5612–21.
- Varon, R, C Vissinga, M Platzer, K M Cerosaletti, K H Chrzanowska, K Saar, G Beckmann, et al. 1998. "Nibrin, a Novel DNA Double-Strand Break Repair Protein, Is Mutated in Nijmegen Breakage Syndrome." *Cell* 93 (3): 467–76.
- Vidi, P.-A., J. Liu, D. Salles, S. Jayaraman, G. Dorfman, M. Gray, P. Abad, et al. 2014. "NuMA Promotes Homologous Recombination Repair by Regulating the Accumulation of the ISWI ATPase SNF2h at DNA Breaks." *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6365–79.
- Vignard, Julien, Gladys Mirey, and Bernard Salles. 2013. "Ionizing-Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks: A Direct and Indirect Lighting up." *Radiotherapy and Oncology* 108 (3): 362–69.
- Wakasugi, Mitsuo, Aki Kawashima, Hiroshi Morioka, Stuart Linn, Aziz Sancar, Toshio Mori, Osamu Nikaido, and Tsukasa Matsunaga. 2002. "DDB Accumulates at DNA Damage Sites Immediately after UV Irradiation and Directly Stimulates Nucleotide Excision Repair." *Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1637–40.
- Walker, John R., Richard A. Corpina, and Jonathan Goldberg. 2001. "Structure of the Ku

- Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair.” *Nature* 412 (6847): 607–14.
- Walker, M, E J Black, V Oehler, D A Gillespie, and M T Scott. 2009. “Chk1 C-Terminal Regulatory Phosphorylation Mediates Checkpoint Activation by de-Repression of Chk1 Catalytic Activity.” *Oncogene* 28 (24): 2314–23.
- Walter, J, and J Newport. 2000. “Initiation of Eukaryotic DNA Replication: Origin Unwinding and Sequential Chromatin Association of Cdc45, RPA, and DNA Polymerase Alpha.” *Molecular Cell* 5 (4): 617–27.
- Wang, Hongyan, Minli Wang, Huichen Wang, Wilfried Böcker, and George Iliakis. 2005. “Complex H2AX Phosphorylation Patterns by Multiple Kinases Including ATM and DNA-PK in Human Cells Exposed to Ionizing Radiation and Treated with Kinase Inhibitors.” *Journal of Cellular Physiology* 202 (2): 492–502.
- Wang, Minli, Weizhong Wu, Wenqi Wu, Bustanur Rosidi, Lihua Zhang, Huichen Wang, and George Iliakis. 2006. “PARP-1 and Ku Compete for Repair of DNA Double Strand Breaks by Distinct NHEJ Pathways.” *Nucleic Acids Research* 34 (21): 6170–82.
- Wang, Xiao Qi, J. Leslie Redpath, Sheung Tat Fan, and Eric J. Stanbridge. 2006. “ATR Dependent Activation of Chk2.” *Journal of Cellular Physiology* 208 (3): 613–19.
- Wang, Y.-G., C. Nnakwe, W. S. Lane, M. Modesti, and K. M. Frank. 2004. “Phosphorylation and Regulation of DNA Ligase IV Stability by DNA-Dependent Protein Kinase.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37282–90. doi:10.1074/jbc.M401217200.
- Warbrick, E. 2000. “The Puzzle of PCNA’s Many Partners.” *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22 (11): 997–1006.
- Ward, I M, and J Chen. 2001. “Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-Dependent Manner in Response to Replicational Stress.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47759–62.
- Ward, Irene M., Xianglin Wu, and Junjie Chen. 2001. “Threonine 68 of Chk2 Is Phosphorylated at Sites of DNA Strand Breaks.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47755–58. doi:10.1074/jbc.C100587200.
- Ward, Irene M, Kay Minn, and Junjie Chen. 2004. “UV-Induced Ataxia-Telangiectasia-

- Mutated and Rad3-Related (ATR) Activation Requires Replication Stress.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9677–80.
- Wei, Y F, P Robins, K Carter, K Caldecott, D J Pappin, G L Yu, R P Wang, B K Shell, R A Nash, and P Schär. 1995. “Molecular Cloning and Expression of Human cDNAs Encoding a Novel DNA Ligase IV and DNA Ligase III, an Enzyme Active in DNA Repair and Recombination.” *Molecular and Cellular Biology* 15 (6): 3206–16.
- Winkler, G S, S J Araújo, U Fiedler, W Vermeulen, F Coin, J M Egly, J H Hoeijmakers, R D Wood, H T Timmers, and G Weeda. 2000. “TFIIH with Inactive XPD Helicase Functions in Transcription Initiation but Is Defective in DNA Repair.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4258–66.
- Wohlschlegel, James A., Jeffery L. Kutok, Andrew P. Weng, and Anindya Dutta. 2002. “Expression of Geminin as a Marker of Cell Proliferation in Normal Tissues and Malignancies.” *The American Journal of Pathology* 161 (1): 267–73.
- Wu, L, S L Davies, N C Levitt, and I D Hickson. 2001. “Potential Role for the BLM Helicase in Recombinational Repair via a Conserved Interaction with RAD51.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19375–81.
- Wu, Qian, Takashi Ochi, Dijana Matak-Vinkovic, Carol V. Robinson, Dimitri Y. Chirgadze, and Tom L. Blundell. 2011. “Non-Homologous End-Joining Partners in a Helical Dance: Structural Studies of XLF-XRCC4 Interactions.” *Biochemical Society Transactions* 39 (5): 1387–92.
- Xia, Shaoyou, Wenyu Hou, Huaxia Yang, Yuefeng Hou, and Rong Li. 2016. “The Interaction between TopBP1 and MCM Complex Is Essential for TopBP1 Foci Formation in Colon Cancer.” *Translational Cancer Research* 5 (5): 538–45.
- Xie, Anyong, Amy Kwok, and Ralph Scully. 2009. “Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (8): 814–18.
- Xiong, Y, H Zhang, and D Beach. 1993. “Subunit Rearrangement of the Cyclin-Dependent Kinases Is Associated with Cellular Transformation.” *Genes & Development* 7 (8): 1572–83.

- Xu, Ye, Yingli Sun, Xiaofeng Jiang, Marina K. Ayrappetov, Patryk Moskwa, Shenghong Yang, David M. Weinstock, and Brendan D. Price. 2010. "The p400 ATPase Regulates Nucleosome Stability and Chromatin Ubiquitination during DNA Repair." *The Journal of Cell Biology* 191 (1): 31–43.
- Yajima, Hirohiko, Kyung-Jong Lee, Shichuan Zhang, Junya Kobayashi, and Benjamin P.C. Chen. 2009. "DNA Double-Strand Break Formation upon UV-Induced Replication Stress Activates ATM and DNA-PKcs Kinases." *Journal of Molecular Biology* 385 (3): 800–810.
- Yamane, Kenichi, Takeshi Mizuguchi, Bowen Cui, Martin Zofall, Ken-ichi Noma, and Shiv I.S. Grewal. 2011. "Asf1/HIRA Facilitate Global Histone Deacetylation and Associate with HP1 to Promote Nucleosome Occupancy at Heterochromatic Loci." *Molecular Cell* 41 (1): 56–66.
- Yan, H, S Gibson, and B K Tye. 1991. "Mcm2 and Mcm3, Two Proteins Important for ARS Activity, Are Related in Structure and Function." *Genes & Development* 5 (6): 944–57.
- Yannone, S M, S Roy, D W Chan, M B Murphy, S Huang, J Campisi, and D J Chen. 2001. "Werner Syndrome Protein Is Regulated and Phosphorylated by DNA-Dependent Protein Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38242–48.
- Yokoi, M, C Masutani, T Maekawa, K Sugawara, Y Ohkuma, and F Hanaoka. 2000. "The Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex XPC-HR23B Plays an Important Role in the Recruitment of Transcription Factor IIH to Damaged DNA." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9870–75.
- Yoo, Hae Yong, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, and William G Dunphy. 2004. "Mcm2 Is a Direct Substrate of ATM and ATR during DNA Damage and DNA Replication Checkpoint Responses." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53353–64.
- Yoo, S, and W S Dynan. 1999. "Geometry of a Complex Formed by Double Strand Break Repair Proteins at a Single DNA End: Recruitment of DNA-PKcs Induces Inward Translocation of Ku Protein." *Nucleic Acids Research* 27 (24): 4679–86.
- Yoshida, Kiyotsugu, and Yoshio Miki. 2004. "Role of BRCA1 and BRCA2 as Regulators of

- DNA Repair, Transcription, and Cell Cycle in Response to DNA Damage.” *Cancer Science* 95 (11): 866–71.
- You, Z., Yukio Ishimi, Hisao Masai, and Fumio Hanaoka. 2002. “Roles of Mcm7 and Mcm4 Subunits in the DNA Helicase Activity of the Mouse Mcm4/6/7 Complex.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42471–79.
- You, Z, Y Komamura, and Y Ishimi. 1999. “Biochemical Analysis of the Intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA Helicase Activity.” *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8003–15.
- You, Zhongsheng, Charly Chahwan, Julie Bailis, Tony Hunter, and Paul Russell. 2005. “ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (13): 5363–79.
- Yu, Jinzhong, Ruijie Wang, Jinfeng Wu, Zhongqin Dang, Qinsheng Zhang, and Bo Li. 2016. “Knockdown of Minichromosome Maintenance Proteins Inhibits Foci Forming of Mediator of DNA-Damage Checkpoint 1 in Response to DNA Damage in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma TE-1 Cells.” *Biochemistry (Moscow)* 81 (10). Pleiades Publishing: 1221–28.
- Yu, Y, Mahaney B, Yano K, Ye R, Fang S, Douglas P, Chen D, and S Lees-Miller SP. 2008. “DNA-PK and ATM Phosphorylation Sites in XLF/Cernunnos Are Not Required for Repair of DNA Double Strand Breaks.” *DNA Repair* 7 (10): 1680–92.
- Zachariae, W, and K Nasmyth. 1999. “Whose End Is Destruction: Cell Division and the Anaphase-Promoting Complex.” *Genes & Development* 13 (16): 2039–58.
- Zaitseva, Lyubov et al. 2009. “HIV-1 Exploits Importin 7 to Maximize Nuclear Import of Its DNA Genome.” *Retrovirology* 6(1):11.
- Zhang, Junran, Henning Willers, Zhihui Feng, Jagadish C Ghosh, Sang Kim, David T Weaver, Jay H Chung, Simon N Powell, and Fen Xia. 2004. “Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair.” *Molecular and Cellular Biology* 24 (2): 708–18.
- Zhang, Yanbin, Fenghua Yuan, Steven R Presnell, Keli Tian, Yin Gao, Alan E Tomkinson, Liya Gu, and Guo-Min Li. 2005. “Reconstitution of 5’-directed Human Mismatch Repair in

- a Purified System." *Cell* 122 (5): 693–705.
- Zhang, Ye, Larry H Rohde, and Honglu Wu. 2009. "Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms in Double Strand Break Repair." *Current Genomics* 10 (4). Bentham Science Publishers: 250–58.
- Zhang, Yu, and Maria Jasin. 2011. "An Essential Role for CtIP in Chromosomal Translocation Formation through an Alternative End-Joining Pathway." *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (1): 80–84.
- Zhao, Zhen, Soohwan Oh, Dapeng Li, Duoqiao Ni, Sara Dolatshahi Pirooz, Joo-Hyung Lee, Shunhua Yang, et al. 2012. "A Dual Role for UVRAG in Maintaining Chromosomal Stability Independent of Autophagy." *Developmental Cell* 22 (5): 1001–16.
- Zheng, Lu, Radhakrishnan Kanagaraj, Boris Mihaljevic, Sybille Schwendener, Alessandro A Sartori, Bertran Gerrits, Igor Shevelev, and Pavel Janscak. 2009. "MRE11 Complex Links RECQ5 Helicase to Sites of DNA Damage." *Nucleic Acids Research* 37 (8): 2645–57.
- Zhu, Wenge, and Melvin L Depamphilis. 2009. "Selective Killing of Cancer Cells by Suppression of Geminin Activity." *Cancer Research* 69 (11). NIH Public Access: 4870–77.
- Ziv, Yael, Dana Bielopolski, Yaron Galanty, Claudia Lukas, Yoichi Taya, David C Schultz, Jiri Lukas, Simon Bekker-Jensen, Jiri Bartek, and Yosef Shiloh. 2006. "Chromatin Relaxation in Response to DNA Double-Strand Breaks Is Modulated by a Novel ATM- and KAP-1 Dependent Pathway." *Nature Cell Biology* 8 (8): 870–76.
- Zotter, Angelika, Martijn S Luijsterburg, Daniël O Warmerdam, Shehu Ibrahim, Alex Nigg, Wiggert A van Cappellen, Jan H J Hoeijmakers, Roel van Driel, Wim Vermeulen, and Adriaan B Houtsmuller. 2006. "Recruitment of the Nucleotide Excision Repair Endonuclease XPG to Sites of UV-Induced Dna Damage Depends on Functional TFIIH." *Molecular and Cellular Biology* 26 (23). American Society for Microbiology (ASM): 8868–79.
- Zou, L., and Stephen J Elledge. 2003. "Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes." *Science* 300 (5625): 1542–48.

ANNEXE 1

Quantitative proteomics reveals dynamic interactions of the MCM complex in the cellular response to etoposide induced DNA damage

Romain Drissi, Marie-Line Dubois, Mélanie Douziech and François-Michel Boisvert¹

Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, 3201 Jean-Mignault,
Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada

Quantitative proteomics reveals dynamic interactions of the MCM complex in the cellular response to etoposide induced DNA damage

Romain Drissi, Marie-Line Dubois, Mélanie Douziech and François-Michel Boisvert¹

Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, 3201 Jean-Mignault,
Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada

¹ Corresponding author: François-Michel Boisvert

Phone: 819-821-8000 Ext.75430

Fax: 819-820-6831

Email: fm.boisvert@usherbrooke.ca

Running title: A role for the MCM complex in DNA repair

Keywords: MCM complex, DNA Repair, ASF1, Mass Spectrometry, SILAC

SUMMARY

The minichromosome maintenance complex (MCM) proteins are required for processive DNA replication and are a target of S-phase checkpoints. The eukaryotic MCM complex consists of six proteins (MCM2-7) that form a heterohexameric ring with DNA helicase activity which is loaded on chromatin to form the pre-replication complex. Upon entry in S phase, the helicase is activated and opens the DNA duplex to recruit DNA polymerases at the replication fork. The MCM complex thus plays a crucial role during DNA replication, but recent work suggests that MCM proteins could also be involved in DNA repair. Here, we employed a combination of stable isotope labelling with amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics with immunoprecipitation of GFP-tagged fusion proteins to identify proteins interacting with the MCM complex, and quantify changes in interactions in response to DNA damage. Interestingly, the MCM complex showed very dynamic changes in interaction with proteins such as Importin7, the histone chaperone ASF1, and the Chromodomain helicase DNA binding protein 3 (CHD3) following DNA damage. These changes in interactions were accompanied by an increase in phosphorylation and ubiquitination on specific sites on the MCM proteins and an increase in the co-localization of the MCM complex with γ -H2AX, confirming the recruitment of these proteins to sites of DNA damage. In summary, our data indicate that the MCM proteins are involved in chromatin remodelling in response to DNA damage.

INTRODUCTION

DNA replication during the S phase necessitates that the entire genome be duplicated with the minimum of errors. Thousands of replication forks are involved in this process and they must be coordinated to ensure that every section of DNA is only replicated once. Errors in DNA replication are likely to be a major cause of the genetic instability that can lead to cancer (1). Cells are able to prevent duplicate replication of DNA by having a distinct stage that occurs during the G1 phase when replication origins are “licensed” for replication, a process that involves the pre-loading of several proteins involved in DNA replication (2). As DNA is replicated at each origin, these proteins are removed, thereby ensuring that each origin fires only once during each S phase. DNA damage response kinases activated by the stalled forks prevent the replication machinery from being activated in new chromosome domains, indicating a tight relationship between the DNA damage response and the DNA replication pathways (3, 4).

The first step of replication licensing mechanism is the loading of the MCM (minichromosome maintenance) proteins on to replication origins along with origin recognition complex proteins (ORC), Cdt6 and Cdt1 (5). The eukaryotic MCM complex consists of six paralogs that form a heterohexameric ring. All eukaryotic organisms possess six homologous proteins (MCM2–MCM7) that form a heterohexameric ring that belong to the family of AAA+ (ATPase associated with various cellular activities) proteins and share similarities to other hexameric helicases (6). Even though additional MCM proteins have been identified in higher eukaryotes, the MCM2–MCM7 complex remains the prime candidate for the role of replicative helicase (7). MCM2-7 is required for both initiation and elongation of DNA replication, with its regulation at each stage being an essential player of eukaryotic DNA replication (8). As a critical mechanism to ensure only a single round of

DNA replication, the loading of additional MCM2-7 complexes onto origins of replication is inactivated by redundant mechanisms after passage into S phase (9).

The MCM complex plays a crucial role in determining the replication potential of cells, but recent work suggests that MCM proteins are not only targets of the S-phase checkpoints, but they also interact directly with components of the checkpoint and repair pathways (10, 11). In *yeast*, temperature sensitive MCM cells at restrictive temperature contain numerous foci recognized by the phosphorylated histone H2AX antibody (12), suggesting a role in the repair of DNA double-strand breaks. Although, in principle, only two DNA helicase activities are required to establish a bidirectional replication fork from each origin, a relatively large excess of MCM complexes are loaded at origins of replication and distributed along the chromatin (13). Their function is not well understood, and most of them are displaced from the DNA during S-phase, apparently without having played an active role in DNA replication. The “MCM paradox” refers to the fact that, at least in yeast, *Xenopus*, *Drosophila* and mammalian cells, it is possible to reduce the concentration of MCM proteins by more than 90% without impairing DNA replication (14-18) and also refers to the observation that the majority of MCM complexes do not localize to the sites of DNA synthesis in mammalian cells, further suggesting a potential role for the MCM proteins beyond DNA replication.

Using a combination of stable isotope labelling with amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics (19) with immunoprecipitation of GFP-tagged fusion proteins (20), we identified differences in protein binding partners with the MCM complex following DNA damage. Stable cell lines expressing GFP-tagged MCM2 and MCM5 were used in immunoprecipitation experiments from cells that were either mock treated, or treated with Etoposide for 15, 60 and 240 minutes. Etoposide is an antitumor

drug that stabilizes a covalent complex between the DNA topoisomerase II and DNA by interfering with the cleavage-ligation reaction of the topoisomerase (21). This revealed specific interaction between the MCM complex and several proteins such as Nucleophosmin, BAG2, UPP1 and HDAC10. Interestingly, the MCM complex showed dynamic changes in interaction with Importin7 and the histone chaperone ASF1, and a decrease in interaction with the Chromodomain helicase DNA binding protein 3 (CHD3) resulting from the treatment with etoposide. This increase in interaction with ASF1 was followed by an enrichment of histone proteins, suggesting a novel role for the MCM proteins in histone deposition on chromatin following DNA damage.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and stable cell lines

U2OS and U2OS Flp-In T-Rex cells were grown as adherent cells in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) depleted of arginine and lysine (Life Technologies A14431-01) supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen, 26400-044), 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM GlutaMax. Arginine and lysine were added in either light (Arg0, Sigma, A5006; Lys0, Sigma, L5501), medium (Arg6, Cambridge Isotope Lab (CIL), CNM-2265; Lys4, CIL, DLM-2640), or heavy (Arg10, CIL, CNLM-539; Lys8, CIL, CNLM-291) form to a final concentration of 28 µg/ml for arginine and 49 µg/ml for lysine. L-proline was added to a final concentration of 10 µg/ml to prevent arginine to proline conversion (see supplementary figure). Proteins were tested for >99% incorporation of the label after six passages by mass spectrometry (data not shown). U2OS stable cell lines were generated by transfecting pgLAP1 plasmids containing the cDNA of interest along with pOG44, the plasmid expressing the Flp-recombinase. Cells were then cultured with the

addition of 150 ug/ml Hygromycin B and 15 ug/ml Blasticidine-HCl. For induction of DNA damage, the topoisomerase II inhibitor etoposide (#E1383, Sigma-Aldrich) was used at the indicated concentrations for 1 hour, followed by wash with PBS and fresh normal media added.

Cloning and generation of plasmids

MCM2, MCM5 and ASF1A were amplified by PCR using oligonucleotides that included BP recombination sites from a cDNA library generated by RT-PCR with an oligo-dT following isolation of mRNA by Trizol on U2OS cells. The PCR product was then incorporated by recombination into pDONR 221 (Life Technologies) using BP recombinase and subsequently cloned into pgLAP1 using Gateway cloning (Life Technologies) (22).

Antibodies

The following antibodies were used: anti-GFP (Roche 11814460001), anti-MCM2 (Rabbit polyclonal, Abcam #Ab31159, Cambridge, USA), anti-MCM5 (Rabbit monoclonal, Abcam #Ab75975, Cambridge, USA), anti-ASF1 (Rabbit monoclonal, Cell Signaling #C6E10, Danvers, USA), anti- γ H2AX (Rabbit polyclonal, Santa Cruz #sc-101696, Dallas, USA) and anti-H2B (Rabbit polyclonal, Cell Signaling #2722, Danvers, USA). Secondary antibodies used were anti-mouse IgG-HRP (Goat polyclonal, Santa Cruz #sc-2005, Dallas, USA) and anti-rabbit IgG-HRP (Goat polyclonal, Santa Cruz #sc-2004, Dallas, USA).

Immunofluorescence microscopy

Cells were cultured on glass coverslips in 6-well plates and fixed with 1% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. Fixed cells were washed with PBS and permeabilized using 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 minutes followed by washing in PBS. Coverslips were incubated with primary antibodies diluted in PBS for one

hour, and then washed once in 0.1% Triton X-100 in PBS and twice in PBS. Primary antibodies were detected with Alexa 488 or 546 conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) on coverslips for one hour in PBS. DNA was counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). After wash with PBS, the coverslips were mounted on glass slides on a drop of Shandon Immuno-Mount (Thermo Scientific).

GFP-Immunoprecipitation from SILAC labelled U2OS Cells

Cells grown in each SILAC medium were harvested separately by scraping in PBS and the cell pellets were lysed in IP buffer (1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail) for 10 minutes on ice. The lysates were then centrifugated for 10 minutes at 13,000g at 4 °C and equal amount of proteins were incubated with GFP-trap agarose beads from ChromaTek (Martinsried, Germany) for 2 hours at 4 °C. Beads were then washed three times with IP buffer and twice with PBS. After the last wash, the beads from the three SILAC conditions were resuspended in PBS and combined before removing the remaining PBS. The beads were then resuspended in LDS sample buffer and the samples processed for in-gel digestion.

Gel electrophoresis and in-gel digestion

For each time point, proteins were reduced in 10 mM DTT and alkylated in 50 mM iodoacetamide prior to boiling in loading buffer, and then separated by one-dimensional SDS-PAGE (4–12% Bis-Tris Novex mini-gel, Life Technologies) and visualized by Coomassie staining (Simply Blue Safe Stain, Life Technologies). The entire protein gel lanes were excised and cut into 8 slices each. Every gel slice was subjected to in-gel digestion with trypsin (23). The resulting tryptic peptides were extracted by 1% formic acid, then 100% acetonitrile, lyophilized in a speedvac, and resuspended in 1% formic acid.

LC-MS/MS

Trypsin digested peptides were separated using a Dionex Ultimate 3000 nanoHPLC system. 10 µl of sample (a total of 2 µg) in 1% (vol/vol) formic acid was loaded with a constant flow of 4 µl/min onto an Acclaim PepMap100 C18 column (0.3 mm id x 5 mm, Dionex Corporation). After trap enrichment peptides were eluted off onto a PepMap C18 nano column (75 µm x 50 cm, Dionex Corporation) with a linear gradient of 5-35% solvent B (90% acetonitrile with 0.1% formic acid) over 240 minutes with a constant flow of 200 nl/min. The HPLC system was coupled to an Orbitrap QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc) via an EasySpray source. The spray voltage was set to 2.0 kV and the temperature of the column was set to 40 °C. Full scan MS survey spectra (m/z 350-1600) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 70,000 after accumulation of 1,000,000 ions. The ten most intense peptide ions from the preview scan in the Orbitrap were fragmented by collision induced dissociation (normalised collision energy 35% and resolution of 17,500) after the accumulation of 50,000 ions. Maximal filling times were 250 ms for the full scans and 60 ms for the MS/MS scans. Precursor ion charge state screening was enabled and all unassigned charge states as well as singly, 7 and 8 charged species were rejected. The dynamic exclusion list was restricted to a maximum of 500 entries with a maximum retention period of 40 seconds and a relative mass window of 10 ppm. The lock mass option was enabled for survey scans to improve mass accuracy. Data were acquired using the Xcalibur software.

Quantification and Bioinformatics Analysis

Data were processed, searched and quantified using the MaxQuant software package version 1.4.1.2 as described previously (24) employing the Human Uniprot database (16/07/2013, 88,354 entries). The settings used for the MaxQuant analysis were: 2

miscleavages were allowed; fixed modification was carbamidomethylation on cysteine; enzymes were Trypsin (K/R not before P); variable modifications included in the analysis were methionine oxidation and protein N-terminal acetylation. A mass tolerance of 7 ppm was used for precursor ions and a tolerance of 20 ppm was used for fragment ions. The re-quantify option was selected to calculate the ratio for isotopic patterns not assembled in SILAC pairs as often observed during pulldown experiments (25). To achieve reliable identifications, all proteins were accepted based on the criteria that the number of forward hits in the database was at least 100-fold higher than the number of reverse database hits, thus resulting in a false discovery rate (FDR) of less than 1%. A minimum of 2 peptides were quantified for each protein. Protein isoforms and proteins that cannot be distinguished based on the peptides identified are grouped and displayed on a single line with multiple accession numbers (see supplementary tables).

Data submission

The mass spectrometry data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001949.

RESULTS

Using a quantitative proteomic approach to measure the protein content in different cellular fractions, we utilized a technique called spatial proteomics that measures the cellular distribution of thousands of proteins using a combination of cellular fractionation and mass spectrometry (26). This method involves first culturing cells with SILAC medium to ensure proteins are fully labelled (19). The SILAC incorporated cells are then separated into

fractions, e.g. the cytoplasm and nucleus which are recombined such that each fraction has a distinct isotope signature (Figure 1A). The labeling thus allows quantification of the relative abundance of peptides originating from subcellular fraction and has been used to study the relative distribution of the proteome between the cytoplasm, nucleus and nucleolus (26).

In order to identify proteins potentially involved in the cellular response to DNA damage, we used the spatial proteomics method to identify proteins whose localization would show a change in their subcellular distribution following treatment with etoposide, a topoisomerase II inhibitor causing double-strand breaks (Figure 1B, Supplementary table 1a). Out of 1,933 proteins identified, 93 proteins showed a relocation from the cytoplasmic fraction to the nuclear fraction (Supplementary table 1b). To identify whether proteins with common known cellular functions were specifically affected in response to DNA damage, enrichment in Kegg pathway annotations of the 93 proteins showing a change in cytoplasmic to nuclear localization was analysed (Figure 1C, Supplementary table 1c). We found four different pathways significantly enriched (p-values <0.01) that includes 23 proteins within the group of 93 proteins (Figure 1D&E). The pathways involved were DNA replication, RNA degradation, nucleotide excision repair (NER) and non-homologous end-joining (NHEJ) (Supplementary Table 1c). Of the proteins identified involved in DNA replication, the six proteins forming the MCM complex were identified (Figure 1E).

To further characterize the involvement of the MCM complex in the cellular response to DNA damage, we decided to identify proteins interacting with different MCM proteins in the absence and presence of DNA damage. First, we generated inducible stable cell lines expressing MCM2 and MCM5 at close to endogenous levels. These cell lines were

generated using LAP1-tagged wild type MCM2 and MCM5 with a GFP at the N-terminal (Figure 2) by flp-in recombination into U2OS cells that have a single integration site. The exogenous GFP-MCM2 and GFP-MCM5 proteins were found in similar levels compared to the endogenous proteins (Figure 2A and 2B, lanes 4). In fact, expression of the exogenous protein appear to reduce the amount of the endogenous protein expressed, suggesting a possible mechanism regulating the total amount of MCM proteins present in the cell (Figure 2A and 2B, compare lanes 3 and 4). The GFP-tagged proteins is mostly nuclear as demonstrated by immunofluorescence microscopy (Figure 2C and D).

Next, we investigated which proteins were interacting with MCM2 and MCM5 by performing SILAC-based quantitation of interaction partners for each of those proteins. GFP tagged MCM2 and MCM5 proteins were immunoprecipitated using GFP-TRAP agarose beads, ensuring a near depletion of all the tagged MCM protein from the cell lysate (Figure 3A). We compared GFP-based immunoprecipitates from uninduced cells (light) with doxycycline-induced cells (medium) (Figure 3C). This experimental design allowed discrimination between specific interactions and contaminant proteins. Analysis of the MCM2 experiment identified all the proteins from the MCM complex (MCM2-7, figure 3D), along with several other proteins (figure 3F-G), indicating that the GFP-MCM2 proteins is properly assembled within the MCM complex. Amongst the proteins identified interacting specifically with the MCM complex, we identified with a relatively high ratio of enrichment other known interactors such as MCM binding protein (MCMBP), as well as several chaperones involved in protein folding such as heat shock proteins and protein from the T-complex 1 or CCT complex (Figure 3F-, supplementary table 2a). Such proteins are often identified interacting with exogenously expressed proteins (27), and are thus most likely to be specific interactions to help folding the excess protein, but are less interesting

in understanding the normal interactions of the endogenous proteins. On the other hand, analysis of the MCM5 experiment only identified MCM3 and histones (Figure 3E, supplementary figure 2b), indicating that GFP-MCM5 is only interacting with his direct binding partner (28) and is apparently not forming a functional MCM complex.

To characterize protein interactions that are regulated by DNA damage, we decided to continue with only GFP-MCM2 since it was the only protein to be incorporated in the complete MCM complex (Figure 3). In order to identify interactions that are modulated by the treatment with etoposide, we performed the experiment using triple SILAC labelling of cells. We compared GFP-based immunoprecipitates from uninduced cells (light, control), doxycycline-induced cells (medium) and doxycycline-induced cells that were treated with etoposide for 1 hour, washed and allowed to recover for 15, 60 and 240 minutes (heavy) (Figure 4A). This experimental design allows quantification of interactions that are increased or decreased over time during the cellular response to DNA damage. The levels of GFP-MCM2 immunoprecipitated were similar in each conditions (Figure 4B), and the overall pattern of identification remained similar throughout the experiment (Figure 4C, 4D and supplementary table 3). All proteins from the MCM complex were identified at each time point with similar stoichiometry, confirming the stability of the complex following the treatment with etoposide (Figure 4D). We were able to identify several proteins interacting with the MCM complex, including nucleophosmin, BAG2, UPP1 and HDAC10. All those interactions did not change following the treatment with etoposide (Figure 4D). Ubiquitin was also identified as a protein enriched, but in this case most likely because one or some proteins of the MCM complex are ubiquitinated. We found four proteins whose interaction with the MCM complex appeared to be modulated following the DNA damage treatment (Figure 4D, Supplementary Table 3). Three of those proteins showed an increased in

enrichment, including the histone chaperone ASF1A, the putative tyrosine phosphatase Paladin (PALD1) and Importin-7 (IMP7). On the contrary, the Chromodomain helicase DNA binding protein 3 (CHD3) showed a decrease in interaction following the treatment with etoposide.

Additionally, it was possible to detect post-translational modifications on the immunoprecipitated proteins, indicating extensive modification of the MCM complex by phosphorylation (Figure 5A, green circles). A closer analysis of the phosphorylation sites allowed us to group the phosphorylation following three distinct consensus sites (Figure 5B, C and D). The SSP motif is known to be phosphorylated on the MCM proteins by the Cdc7/Dbf4 complex which is responsible for allowing initiation of DNA replication by activation of the MCM complex (29). Our data did not show any increases in the phosphorylation at these sites, indicating that the treatment with etoposide did not activate initiation of DNA replication or synchronisation of cells in S phase (Figure 5B). The (E/D)(S/T)(E/D)EE motif corresponds to the canonical phosphorylation motif of casein kinase II (CKII), a kinases with pleiotropic functions that has also been implicated with regulating DNA replication (30). Again, most of these sites did not show any increase in phosphorylation (Figure 5C). Interestingly, three phosphorylation sites, one on each of the MCM2, MCM3 and MCM6 proteins followed the SQ consensus sites for the DNA repair signalling kinases ATM, ATR and DNA-PK (31, 32) and were found to be increased (Figure 5D), suggesting that the DNA damage induced by the treatment with etoposide specifically resulted in phosphorylation of the MCM complex (Figure 5D). Finally, because ubiquitin was identified as an interacting protein with the MCM complex, the presence of a diglycine peptide signature of ubiquitin modifications was investigated (33-35). It was possible to identify twelve ubiquitination sites on the MCM proteins (Figure 5A, purple

circle). The quantification of this modification following the treatment with etoposide showed that ten of the twelve possible ubiquitination sites were upregulated upon DNA damage (Figure 5E).

To confirm the changes in interactions observed following DNA damage (Figure 4D), immunoprecipitations of GFP-MCM2 were performed in either mock treated cells, or cells treated with etoposide for 1 hour, washed and allowed to recover for 1 and 4 hours (Figure 6). Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblots of total cell lysates with GFP and ASF1 antibodies did not show any change in the total amount of protein present (Figure 6A, lane 1, 3 and 5). However, an increased in the amount of ASF1 was observed (Figure 6A, compare lane 2, 4 and 6), confirming the increase in interaction between the MCM complex and ASF1. To confirm the presence of DNA damage, phosphorylation of H2AX on serine 139 (γ H2AX) was assessed with and without treatment with etoposide (Figure 6B, TCL). Treatment with etoposide indeed caused an increase in phosphorylation (Figure 6B, lane 3 versus lane 1 and 2). However, the amount of histones present was low as shown by the relatively weak signal obtained (Figure 6B). This could be explained by the extraction method using a 1% triton-X100 lysis buffer which may not allow a strong extraction of chromatin proteins. Thus, we decided to use a more stringent extraction method using RIPA buffer. When comparing the amount of histones H2AX extracted between the two conditions (Figure 6B and C, TCL), it appeared that RIPA was able to solubilize a larger amount of histones. To determine whether the interaction between the MCM complex and ASF1 could be associated with chromatin, MCM2 was immunoprecipitated from either mock-treated cells, or cells treated with etoposide for 1 hour using either triton X-100 or RIPA buffer. Immunoblots with a GFP antibody shows

that the majority of MCM2 was found in the triton X-100 extraction (Figure 6B). However, the interaction with ASF1 appeared to be predominantly found when the cells were extracted with RIPA buffer (Figure 6C), suggesting that while most of the MCM complex is not necessarily associated with chromatin, the association between ASF1 and MCM2 appears to be.

To test whether the interaction between the MCM complex and ASF1 was associated with sites of DNA damage, we assessed the localization of MCM2 and ASF1 in cells before and after DNA damage. DNA damage was induced with etoposide, but with a smaller dose than used in the protein interaction experiments because the signal for γ H2AX was too high and undefined in the cells at those higher doses. In the absence of DNA damage, MCM2 and ASF1 were detected throughout the nucleus, but excluded from the nucleolus in the absence of DNA damage (Figure 7C and K), with little to no signal for γ H2AX (Figure 7B and J). Following treatment with etoposide for one hour, a large increase in the signal for γ H2AX was observed (Figure 7F and N). Interestingly, we found some partial co-localization of MCM2 with γ H2AX (Figure 7H) in some of the foci, that was present in some of the cells. ASF1 showed an even greater effect on its co-localization with γ H2AX following the treatment with etoposide (Figure 7P). Because not all cells showed a co-localization, we counted the percentage of cells with three or more obvious co-localization foci at different time of recovery following treatment with etoposide for both MCM2 and ASF1 (more than 100 cells per time point, 3 independent experiments). The number of foci was selected to avoid counting random events. In both cases, we found a significant increase in the co-localization of the protein with γ H2AX, confirming the presence of these proteins to sites of DNA damage.

DISCUSSION

Our data quantifying changes in protein subcellular localisation following treatment with etoposide identified proteins that may play a role in the cellular response to DNA damage. The specificity of the effect observed is underlined by the fact that most of the proteome was not affected by the etoposide treatment, but only a small subset of proteins (93 of 1,933, less than 5%). Of the proteins identified, several are already known to play a role in DNA repair, confirming that our approach allows the identification of proteins involved in this process. Moreover, the concomitant identification of proteins with similar redistribution provides clues in potential protein interactions or possible common functional mechanisms in which they are involved. We have found known proteins involved in DNA replication clustered with a similar redistribution profile with proteins that were annotated with nucleotide excision repair and non-homologous end joining, suggesting possible mechanisms linking DNA replication and DNA repair. Of the proteins identified involved in DNA replication, the six proteins forming the MCM complex were identified.

The interaction study of the MCM proteins allowed the identification of previously known proteins, as well as new interactions. It is interesting to note that while GFP-MCM5 was expressed at near endogenous levels and showed its expected, mainly nuclear distribution, it was not incorporated in a fully functional MCM complex and we failed to identify most of the known interactors. This underlines the limitations of affinity-purification mass spectrometry experiments even when routinely used controls (apparent molecular weight, level of expression, cellular localization) show normal protein behaviour and the importance of using multiple approaches before making final conclusions regarding protein interaction network data coming from these proteomic experiments. Another interesting

observations is the identification of the MCM binding proteins MCMBP as interacting with MCM2. This was unexpected considering that it was initially proposed that MCMBP could replace MCM2, which would lead to the formation of a different complex with MCM3 to 7 (36). Our results clearly show that MCM2 and MCMBP can be present in the same complex since MCMBP was present when MCM2 was immunoprecipitated.

Four proteins whose interaction with the MCM complex appeared to be modulated following the DNA damage treatment were identified. Three of those proteins showed an increased in enrichment, including ASF1A, Paladin (PALD1) and Importin-7. Paladin is an uncharacterized protein with a putative STY phosphatase domain with no known function. Considering that the MCM complex is phosphorylated on multiple sites, there is an interesting possibility that MCM proteins may be a substrate of Paladin. CHD3 is an ATP-dependent chromatin remodeller member of the class II of CHD proteins, which are characterised by the lack of identifiable DNA-binding domains. CHD3 is a component of the histone deacetylase NuRD complex which participates in the compaction of chromatin by deacetylating histones and has been found to be involved in nucleosome remodelling during the DNA double-strand break response (37). Depletion of CHD3 has been shown to results in greater phosphorylation of H2AX and an increase in cell cycle checkpoint sensitivity, demonstrating a role for chromatin compaction in the propagation of DNA damage signalling (38). Interestingly, CHD3 has also been shown to be recruited to sites of DNA damage (39). ASF1 is a histone chaperone that facilitates import of histones into the nucleus (40) and is involved in depositing histone on chromatin during DNA replication (41). Our results are in agreement with the previous identification of an MCM-ASF1 complex associated with histones (42), and our data demonstrate that this interaction is modulated in response to DNA damage. This suggest that additional MCM-ASF1

complexes are assembled following DNA damage which could be involved in chromatin assembly at sites of DNA damage. This could be coordinated with the decrease in interaction of the MCM complex with CHD3, involved in the opposite function of compacting chromatin. These changes in interactions observed was not the results of the activation of DNA replication or the arrest of cells in S-phase, as we did not observed any increase in phosphorylation on the MCM proteins at sites known to be involved in activation of the DNA replication fork. Furthermore, the time points used are most likely too short for any significant cell cycle synchronisation to occur. On the other hand, phosphorylation of MCM proteins on consensus sites that are generally considered a hallmark of DNA damage response proteins were found increased, suggesting a mechanism regulating the MCM complex in response to DNA damage.

Ubiquitination is a post-translational modification that can target protein for degradation, but has also been shown to regulate cellular processes such as cell-cycle, apoptosis, and DNA repair by targeting specific regulatory proteins (43). The proteasome has been involved in the regulation of several DNA repair pathways such as the nucleotide excision repair (NER) and homologous recombination (HR) (reviewed in (44)). We have identified by mass spectrometry a total of twelve ubiquitination sites distributed on several proteins of the MCM complex, notably MCM2, MCM3, MCM4 and MCM7. Of those, several sites were significantly increased following DNA damage. Interestingly, we identified the proteins DDB1 and CUL4 showing a similar redistribution following DNA damage (Figure 1), as well as interacting with the MCM-ASF1 complex following DNA damage when performing AP-MS of ASF1 (data not shown). DDB1 is the large subunit (p127) of the heterodimeric DNA damage-binding (DDB) complex while DDB2 (p48) forms the small subunit. This protein complex functions in nucleotide-excision repair and binds to DNA

damage. Defective activity of this complex causes the repair defect in patients with xeroderma pigmentosum complementation group E (XPE) - an autosomal recessive disorder characterized by photosensitivity and early onset of carcinomas. The protein encoded by this gene also functions as an adaptor molecule for the cullin 4 (CUL4) ubiquitin E3 ligase complex by facilitating the binding of substrates to this complex and the ubiquitination of proteins. It is thus possible that the MCM complex is a target for ubiquitination by the DDB/CUL4 ubiquitin ligase.

In summary, we have identified several proteins associated with MCM proteins that may provide insight into its role in chromatin remodelling and histone deposition following DNA damage, for which little biochemical data are currently available. We used an affinity-purification coupled to mass spectrometry based approach to not only identify interaction partners of the MCM complex, but we have also measured the differences in interactions following DNA damage over time. These experiments represents an additional level of complexity to MS-based proteomics that not only identifies proteins but also provides an unbiased and quantitative measurement of the dynamics of protein interaction networks. This information provides insights in protein complexes from cells under specific conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding to FMB is from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-123469) and from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (418404-2012).

REFERENCES

1. Blow, J. J., and Gillespie, P. J. (2008) Replication licensing and cancer--a fatal entanglement? *Nat Rev Cancer* 8, 799-806
2. Blow, J. J., and Dutta, A. (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 476-486
3. Allen, C., Ashley, A. K., Hromas, R., and Nickoloff, J. A. (2011) More forks on the road to replication stress recovery. *J Mol Cell Biol* 3, 4-12
4. Nam, E. A., and Cortez, D. (2011) ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 436, 527-536
5. Bell, S. D., and Botchan, M. R. (2013) The minichromosome maintenance replicative helicase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a012807
6. Sclafani, R. A., Fletcher, R. J., and Chen, X. S. (2004) Two heads are better than one: regulation of DNA replication by hexameric helicases. *Genes & development* 18, 2039-2045
7. Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006) MCM proteins and DNA replication. *Current opinion in cell biology* 18, 130-136
8. Bochman, M. L., and Schwacha, A. (2009) The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 652-683
9. Arias, E. E., and Walter, J. C. (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & development* 21, 497-518
10. Bailis, J. M., and Forsburg, S. L. (2004) MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Genet Dev* 14, 17-21
11. Forsburg, S. L. (2004) Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 109-131
12. Bailis, J. M., and Forsburg, S. L. (2004) MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Genet Dev* 14, 17-21
13. Das, M., Singh, S., Pradhan, S., and Narayan, G. (2014) MCM Paradox: Abundance of Eukaryotic Replicative Helicases and Genomic Integrity. *Molecular biology international* 2014, 574850
14. Crevel, I., Crevel, G., Gostan, T., de Renty, C., Coulon, V., and Cotterill, S. (2011) Decreased MCM2-6 in Drosophila S2 cells does not generate significant DNA damage or cause a marked increase in sensitivity to replication interference. *PLoS One* 6, e27101
15. Crevel, G., Hashimoto, R., Vass, S., Sherkow, J., Yamaguchi, M., Heck, M. M., and Cotterill, S. (2007) Differential requirements for MCM proteins in DNA replication in Drosophila S2 cells. *PLoS One* 2, e833
16. Lei, M., Kawasaki, Y., and Tye, B. K. (1996) Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 5081-5090
17. Oehlmann, M., Score, A. J., and Blow, J. J. (2004) The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation. *J Cell Biol* 165, 181-190
18. Ibarra, A., Schwob, E., and Mendez, J. (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8956-8961
19. Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1, 376-386
20. Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., and Lamond, A. (2008) Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The Journal of cell biology* 183, 223-239

21. Montecucco, A., and Biamonti, G. (2007) Cellular response to etoposide treatment. *Cancer letters* 252, 9-18
22. Torres, J. Z., Miller, J. J., and Jackson, P. K. (2009) High-throughput generation of tagged stable cell lines for proteomic analysis. *Proteomics* 9, 2888-2891
23. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858
24. Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372
25. Cox, J., Matic, I., Hilger, M., Nagaraj, N., Selbach, M., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nature protocols* 4, 698-705
26. Boisvert, F. M., Lam, Y. W., Lamont, D., and Lamond, A. I. (2010) A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9, 457-470
27. Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S., and Frydman, J. (2004) Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends in cell biology* 14, 598-604
28. Maiorano, D., Lemaître, J. M., and Mechali, M. (2000) Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *The Journal of biological chemistry* 275, 8426-8431
29. Sheu, Y. J., and Stillman, B. (2006) Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular cell* 24, 101-113
30. Kulartz, M., Hiller, E., Kappes, F., Pinna, L. A., and Knippers, R. (2004) Protein kinase CK2 phosphorylates the cell cycle regulatory protein Geminin. *Biochemical and biophysical research communications* 315, 1011-1017
31. Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E., and Kastan, M. B. (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *The Journal of biological chemistry* 274, 37538-37543
32. O'Neill, T., Dwyer, A. J., Ziv, Y., Chan, D. W., Lees-Miller, S. P., Abraham, R. H., Lai, J. H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L. C., and Rathbun, G. A. (2000) Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *The Journal of biological chemistry* 275, 22719-22727
33. Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *The Journal of biological chemistry* 258, 8206-8214
34. Marotti, L. A., Jr., Newitt, R., Wang, Y., Aebersold, R., and Dohlman, H. G. (2002) Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* 41, 5067-5074
35. Peng, J., and Gygi, S. P. (2001) Proteomics: the move to mixtures. *Journal of mass spectrometry : JMS* 36, 1083-1091
36. Sakwe, A. M., Nguyen, T., Athanasopoulos, V., Shire, K., and Frappier, L. (2007) Identification and characterization of a novel component of the human minichromosome maintenance complex. *Molecular and cellular biology* 27, 3044-3055
37. Goodarzi, A. A., Kurka, T., and Jeggo, P. A. (2011) KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nature structural & molecular biology* 18, 831-839
38. Brunton, H., Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Shrikhande, A., Hansen, R. S., Jeggo, P. A., and Shibata, A. (2011) Analysis of human syndromes with disordered chromatin reveals the impact of heterochromatin on the efficacy of ATM-dependent G2/M checkpoint arrest. *Molecular and cellular biology* 31, 4022-4035
39. Larsen, D. H., Poinsignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M. R., Hari, F. J., Rendtlew Danielsen, J. M., Menard, P., Sand, J. C., Stucki, M., Lukas, C., Bartek, J., Andersen, J.

- S., and Lukas, J. (2010) The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *The Journal of cell biology* 190, 731-740
40. Campos, E. I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W. H., Seepany, H., Gao, Z., Day, L. A., Greenblatt, J. F., and Reinberg, D. (2010) The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nature structural & molecular biology* 17, 1343-1351
41. Xu, M., Long, C., Chen, X., Huang, C., Chen, S., and Zhu, B. (2010) Partitioning of histone H3-H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly. *Science* 328, 94-98
42. Groth, A., Corpet, A., Cook, A. J., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007) Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* 318, 1928-1931
43. Demartino, G. N., and Gillette, T. G. (2007) Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 129, 659-662
44. Motegi, A., Murakawa, Y., and Takeda, S. (2009) The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: impact on cancer therapy. *Cancer Lett* 283, 1-9

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Protein subcellular relocalisation following DNA damage.

A) Schematic diagram of spatial proteomics to quantify cytoplasmic and nuclear localisation. Proteins from SILAC-labelled cells are biochemically fractionated into cytoplasmic and nuclear fraction which are then recombined prior to identification and quantification by mass spectrometry. B) Nuclear/Cytoplasmic ratios of proteins from mock treated cells (x-axis) compared to proteins treated with 50 μ M Etoposide for 1 hour (y-axis). C) KEGG pathway enrichment analysis on the 93 proteins showing a cytoplasmic to nuclear relocalisation following DNA damage. D) Numeration of the 23 proteins identified in the KEGG pathway enrichment according to the table (E) showing the list of proteins classified in each KEGG pathways.

Figure 2. Generation of inducible stable cell lines expressing GFP-MCM2 and GFP-MCM5.

A) and B) GFP-MCM2 and GFP-MCM5 were generated by Flp-In recombination into U2OS cells at a specific integration site. Whole cell extracts from either non-induced U2OS cells (A and B, lane 1 and 3), or from cells induced for expression of GFP-MCM2 (A, lane

2 and 4) or GFP-MCM5 (B, lane 2 and 4) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with a GFP antibody (A and B, lane 1-2), with a MCM2 antibody (A, lane 3-4) and with a MCM5 antibody (B, lane 3-4) to confirm expression of the GFP-tagged proteins. C-F) Cells induced for expression of GFP-MCM2 (C-D) and GFP-MCM5 (E-F) were fixed and labelled for immunofluorescence using a GFP antibody (D and F) and cells were visualized by phase contrast (C-E). Scale bar = 30 μ m.

Figure 3. AP-MS of GFP-MCM2 and GFP-MCM5 to identify interacting proteins.

A) GFP tagged MCM2 and B) MCM5 proteins were immunoprecipitated using GFP-TRAP agarose beads, ensuring a near depletion of all the tagged MCM protein from the cell lysate. C) SILAC-labelled cells were used for comparison of GFP-based immunoprecipitates from uninduced cells (light) with doxycycline-induced cells (medium). Immunoprecipitates were combined, separated by SDS-PAGE, each gel lane cut into 8 slices prior to in-gel digestion with trypsin. The extracted peptides were analysed by LC-MS/MS. The M/L ratio of two independent experiments for GFP-MCM2 (D) and GFP-MCM5 (E) were plotted and proteins with ratio above the level of the contaminants were identified. F) The average M/L ratios of the two GFP-MCM2 AP-MS experiments were plotted versus the total intensities. G) A zoom over the boxed region in F) for identification of proteins with ratios above the contaminants.

Figure 4. Dynamic interactions of the MCM complex following DNA damage.

A) A schematic representation of the SILAC based AP-MS experiment to identify and quantify proteins interacting with GFP-MCM2 following treatment with etoposide at 50 μ M for 1 hour. SILAC-labelled cells were used for comparison of GFP-based immunoprecipitates from uninduced cells (light), of DMSO (mock) treated cells induced

for GFP-MCM2 expression (medium) and of etoposide treated cells induced for GFP-MCM2 expression (heavy). Immunoprecipitates for each experiments were combined, separated by SDS-PAGE, each gel lane cut into 8 slices prior to in-gel digestion with trypsin. The extracted peptides were analysed by LC-MS/MS. B) Total cell lysates (TCL) and immunoprecipitates from control, GFP-MCM2 mock treated and GFP-MCM2 cells treated with 50 μ M etoposide were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with a GFP antibody. C) Ratios of proteins interacting with GFP-MCM2 from mock treated cells (M/L, x-axis) versus cells treated with etoposide for 1 hour at 50 μ M and allowed to recover for 15, 60 and 240 minutes (H/L, y-axis). D) Identification of proteins identified with the M/L ratios (blue) and the H/L ratios (red) above contaminants at 15, 60 and 240 minutes following treatment with etoposide.

Figure 5. Identification of post-translation modification on the proteins from the MCM complex.

A) Identification of post-translational modifications using either phosphorylation of serine and threonine (green circles) or the presence of a di-glycine peptide (purple circles) as variable modifications indicating extensive modification of the MCM complex. The H/M ratios indicating a change in the presence of the modification following treatment with etoposide is indicated for B) serine phosphorylation on SSP motifs, C) serine/threonine phosphorylation on (E/D)(S/T)(E/D)EE motifs and D) serine phosphorylation of SQ motifs. E) The presence of ubiquitinated peptides of MCM proteins from mock treated cells M/L (blue) and cells treated with 50 μ M etoposide for 1 hour H/L (red) ratios, quantifying the abundance of diglycine peptide signature of ubiquitin-like modifications on the MCM proteins. F) Domains found in the MCM proteins as shown in A include the nuclear

localization signal (NLS), the zinc finger (Zn Finger) as well as the ATPase domain with the Walker A, B and the arginine finger (RF).

Figure 6. Interaction between ASF1 and MCM2 is increased following DNA damage.

A) U2OS cells expressing GFP-MCM2 were either mock treated (lane 1-2) or treated with etoposide at 50 μ M for 1 hour and allowed to recover for either 1 hour (lane 3-4) or 4 hours (lane 5-6). Total cell extracts were immunoprecipitated with GFP-antibodies and immunoblotted with GFP (top) or ASF1A (bottom) antibodies. A similar experiment was performed, but instead comparing protein lysates prepared using either 1% triton X-100 buffer (B) or RIPA buffer (C). Immunoprecipitates (IP) were immunoblotted with antibodies recognizing GFP or ASF1A, and total cell lysates (TCL) were immunoblotted with antibodies recognizing histone H2AX phosphorylated on serine 139 and histone H2B.

Figure 7. Co-localization of MCM2 and ASF1 with sites of DNA damage.

U2OS cells grown on glass coverslips were either mock treated (A-D, I-L) or treated with etoposide at 1 μ M for 1 hour (E-H, M-P) prior to fixation with paraformaldehyde and labelled for immunofluorescence with a γ H2AX antibody (B, F, J, N), a MCM2 antibody (C, G) or a ASF1 antibody (K, O). The merge images are shown (D, H, L, and P). Percentage of cells with three or more obvious co-localization foci at different time of recovery following treatment with etoposide for both MCM2 (Q) and ASF1 (R) (more than 100 cells per time point, n=3).

Figure 1

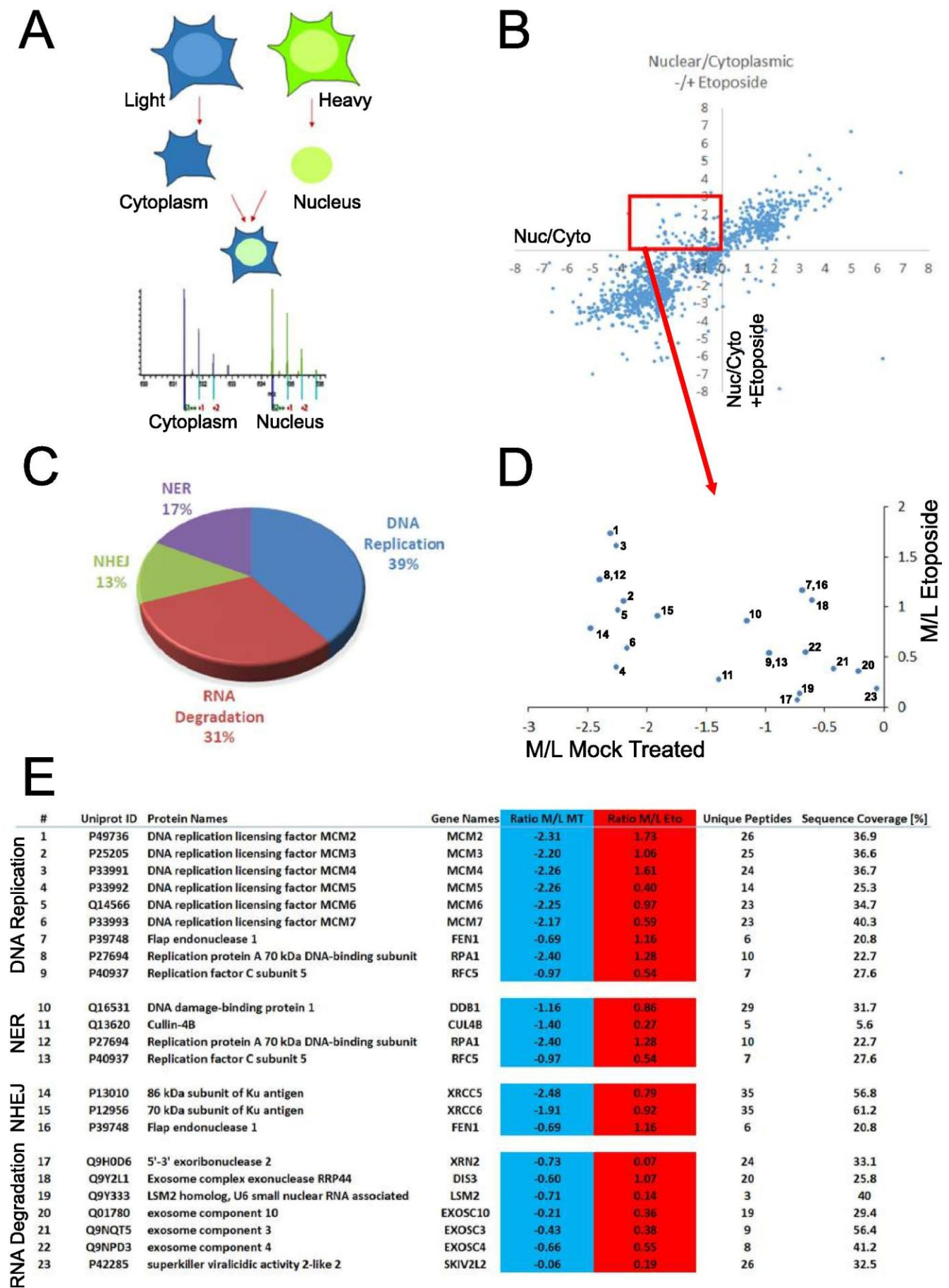


Figure 2

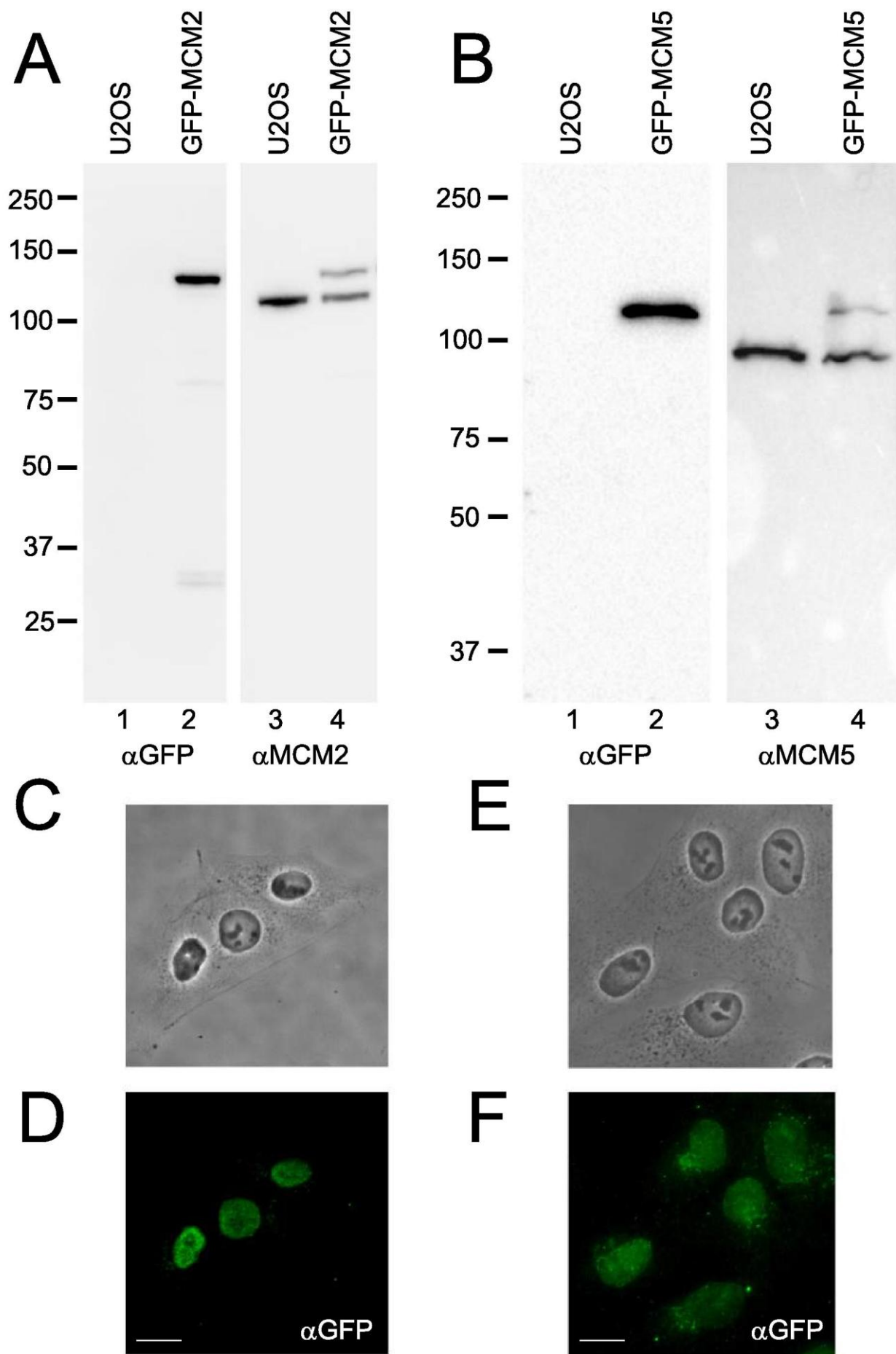


Figure 3

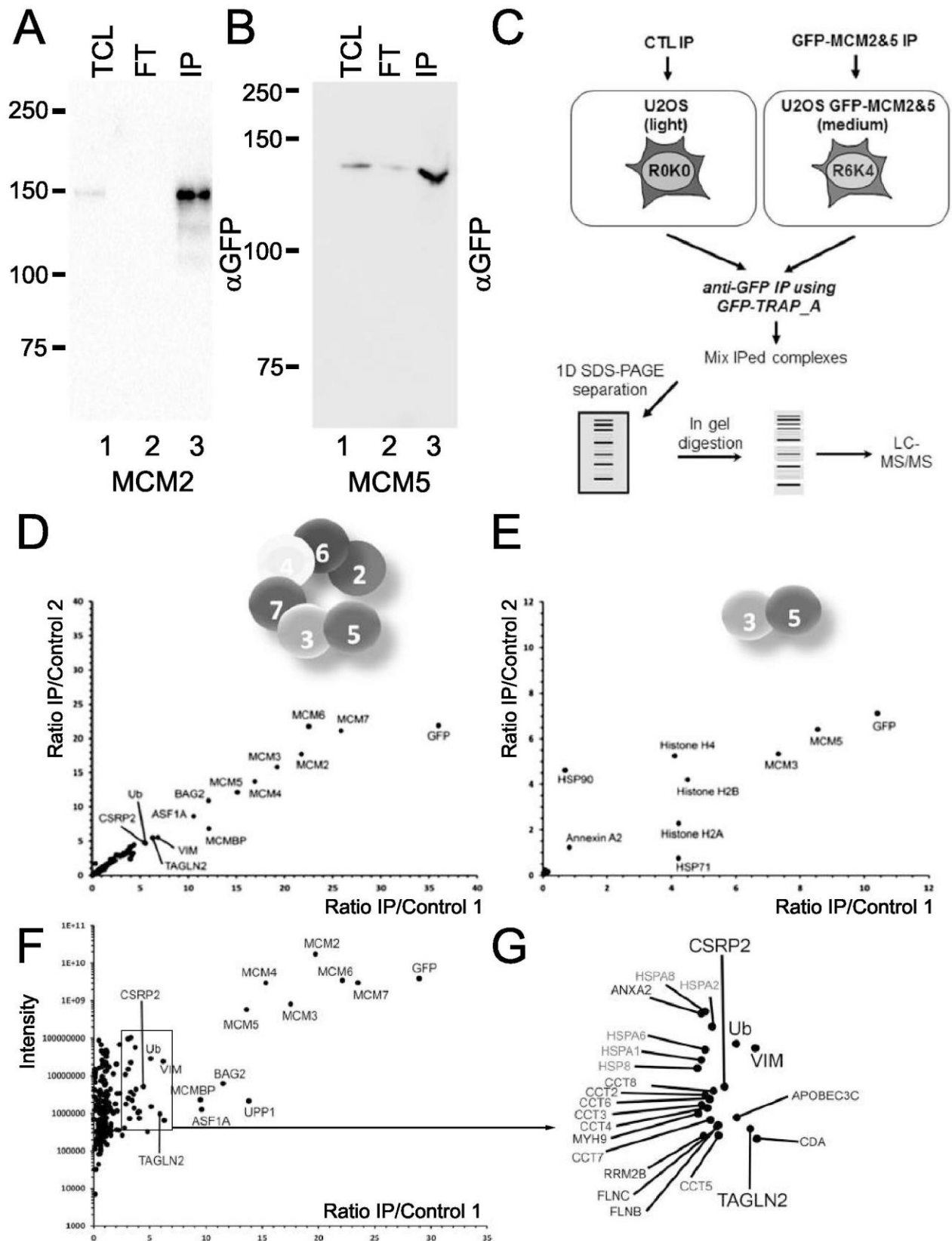


Figure 4

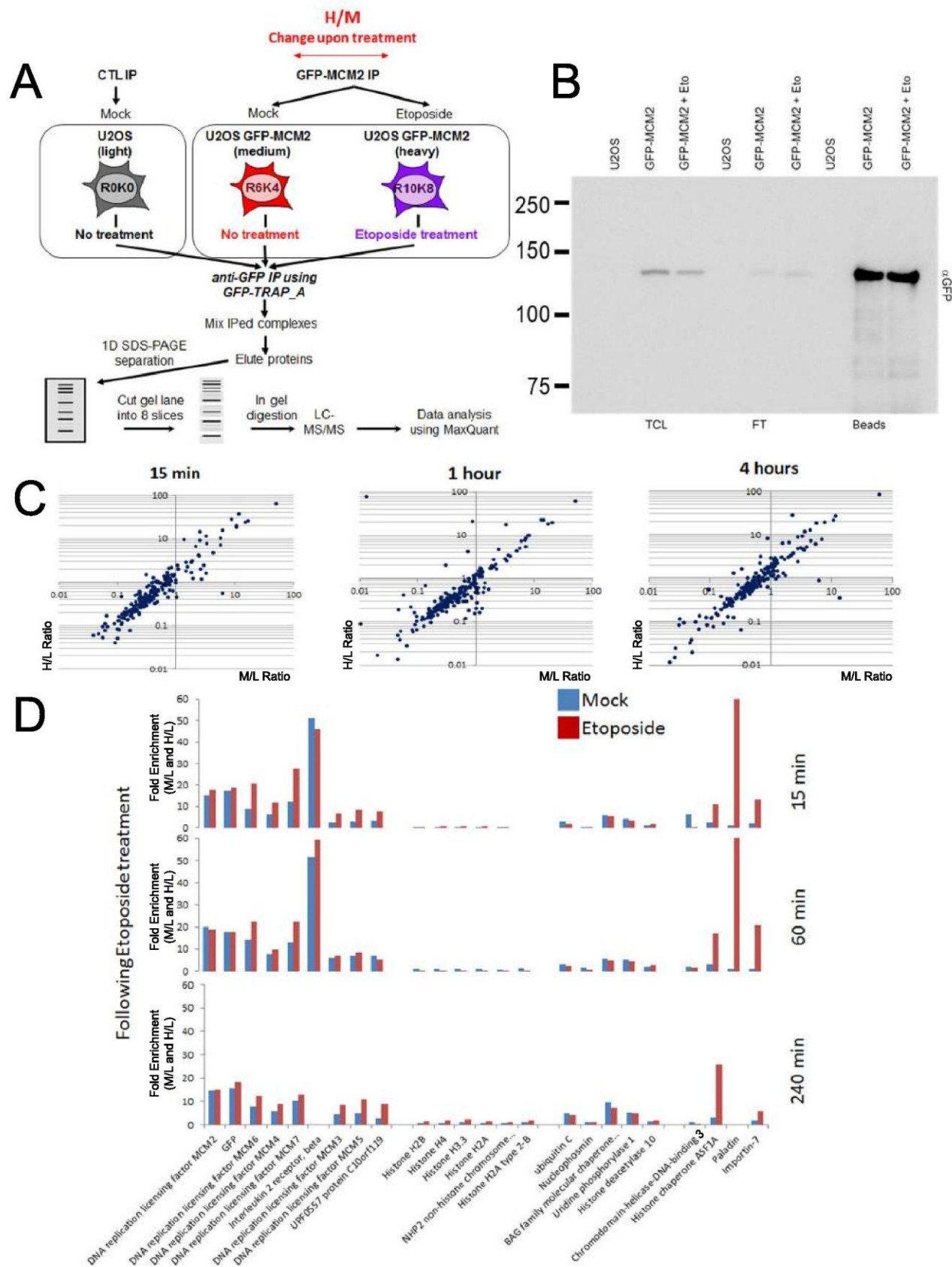
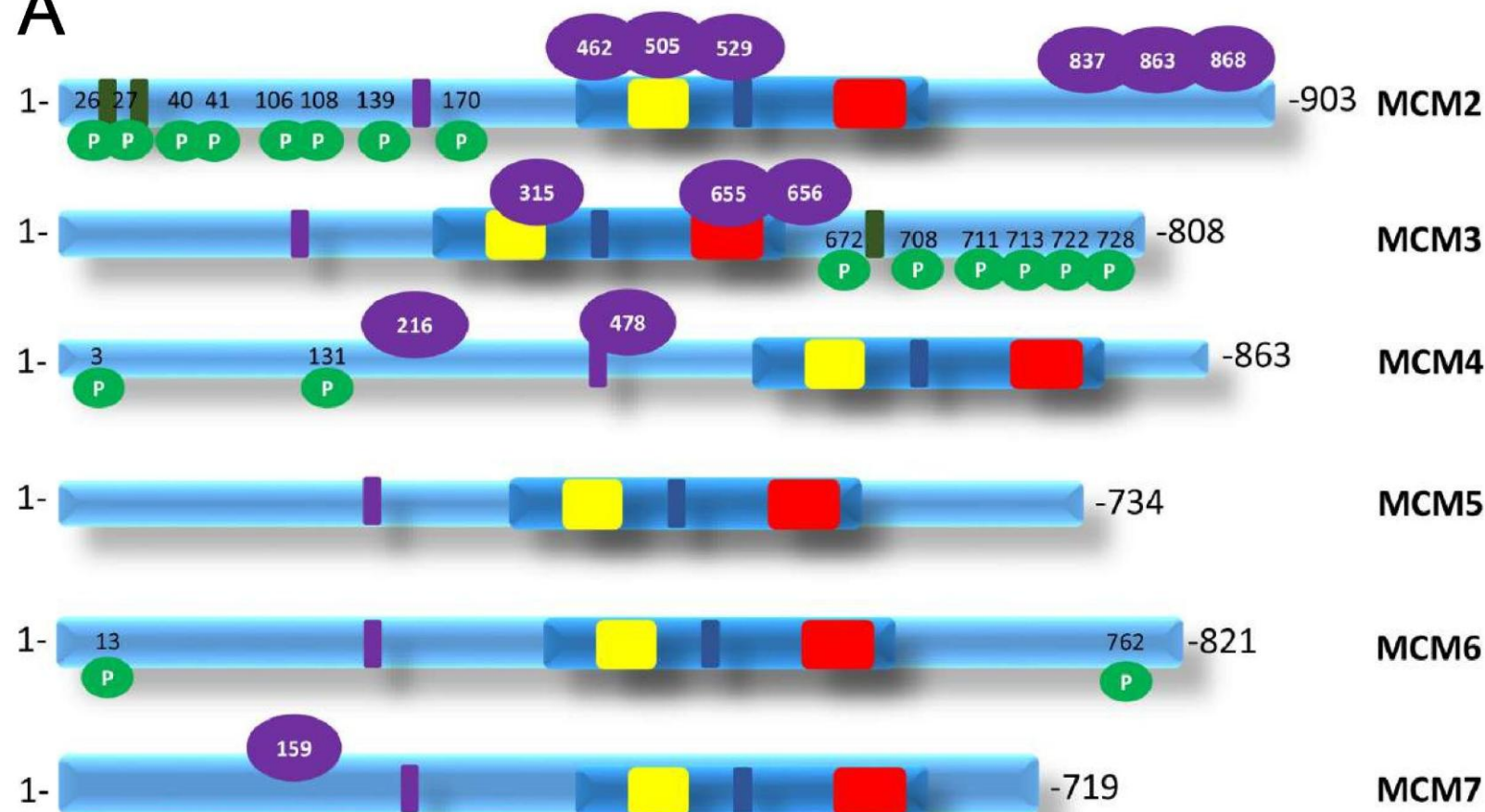


Figure 5

A



B

MCM2 S26	LTSSPG	→ 0.76X
MCM2 S27	LTSSPG	→ 0.83X
MCM2 S40	LTSSPG	→ 0.85X
MCM2 S41	LTSSPG	→ 0.95X
MCM4 S3	MSSPA	→ 1.46X

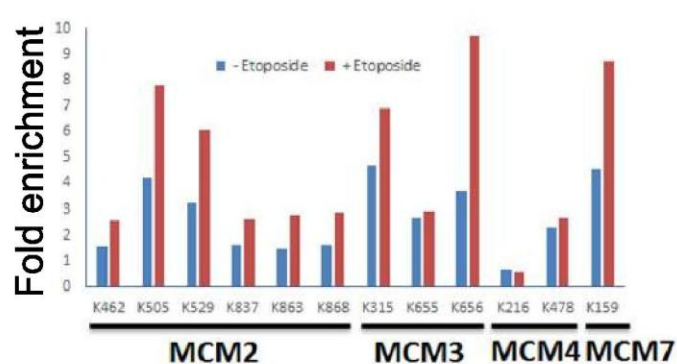
C

MCM2 S139	YDSDEE	→ 0.89X
MCM2 S170	IESIEN	→ 2.80X
MCM3 S672	DESETE	→ 0.85X
MCM3 S711	DFSDEE	→ 0.95X
MCM3 T713	SDTEEE	→ 1.26X
MCM6 S13	IDSEEE	→ 1.80X

D

MCM2 S108	LTASQR	→ 3.60X
MCM3 S728	ADSQET	→ 8.12X
MCM6 S762	GAGSQH	→ 6.55X

E



F

Domains found in all MCM

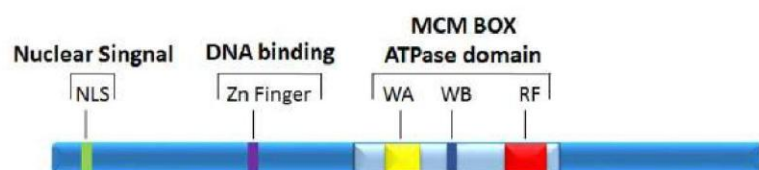


Figure 6

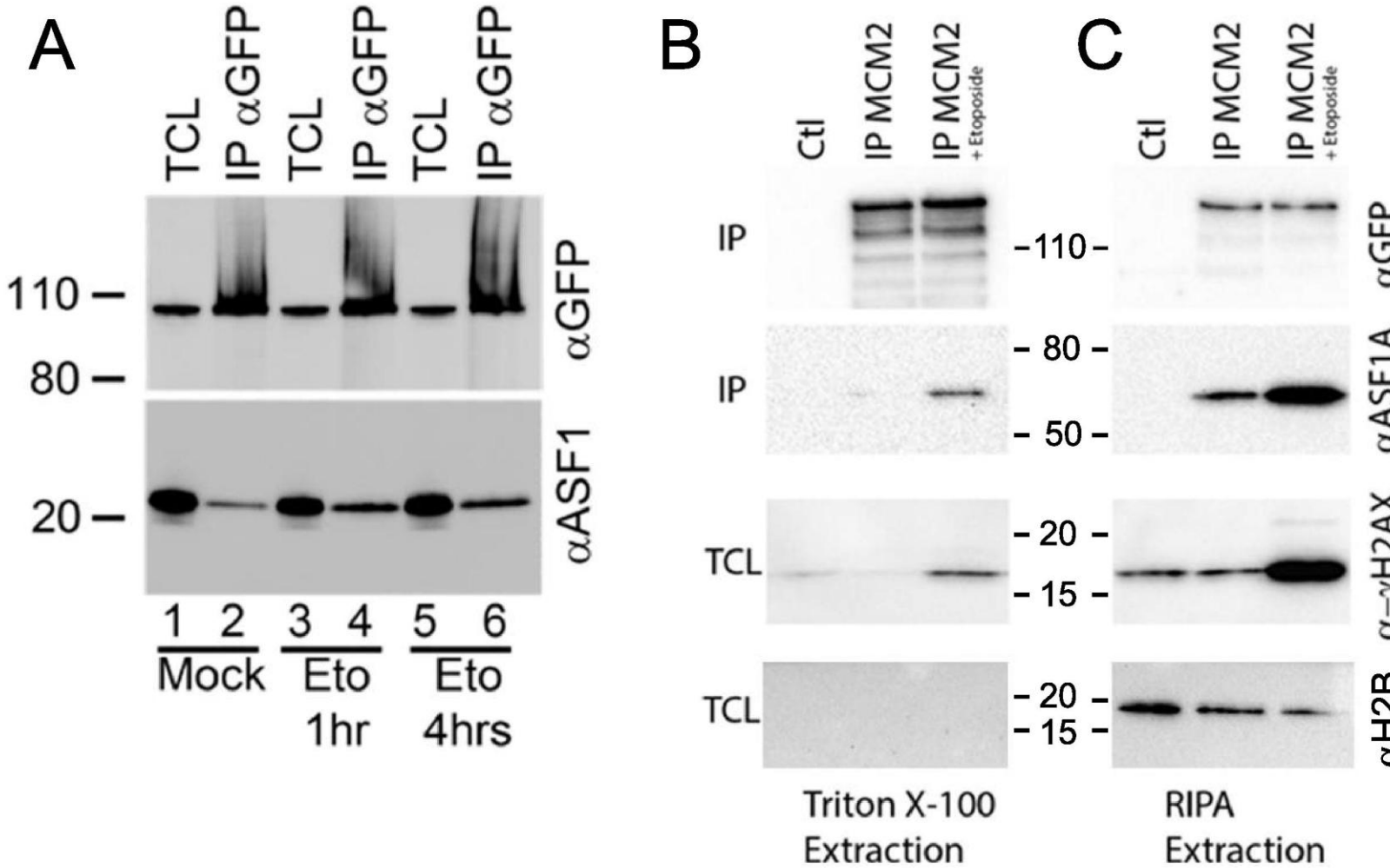
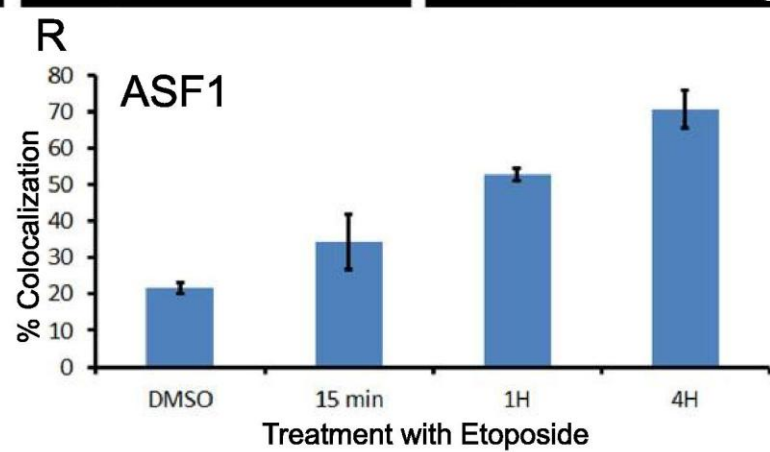
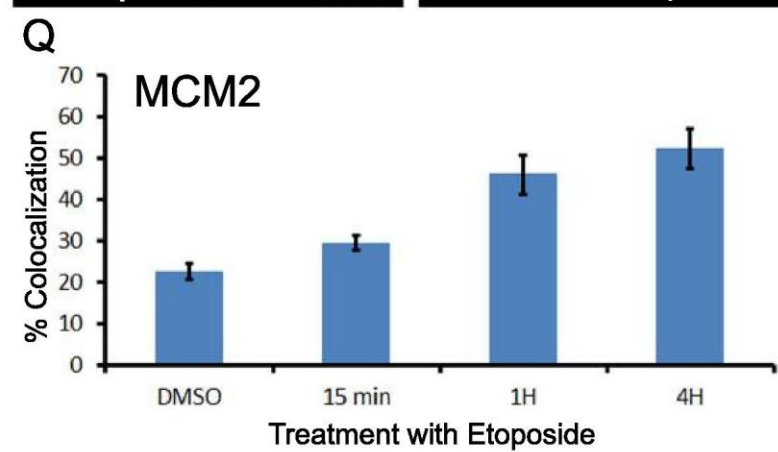
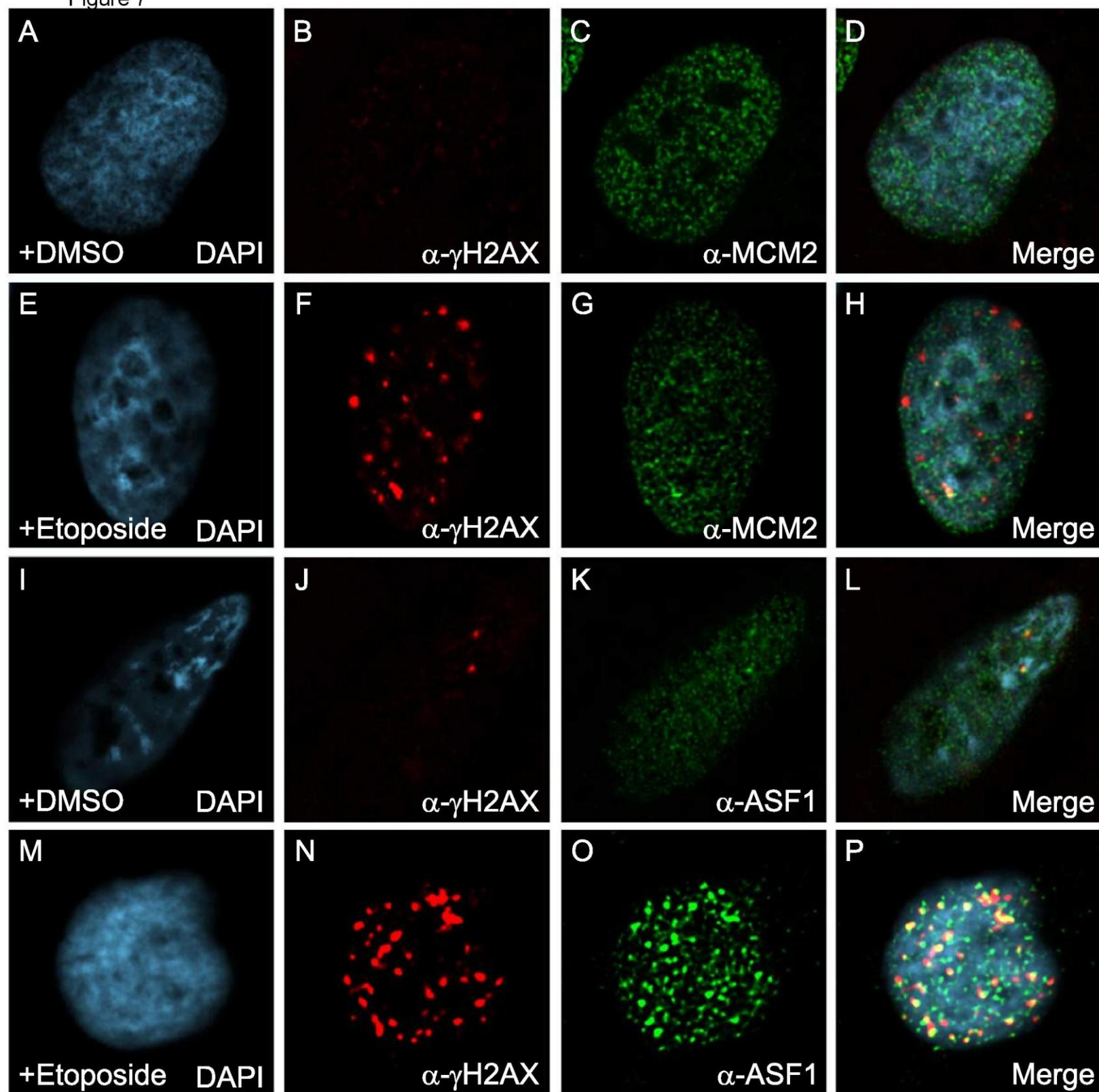


Figure 7



ANNEXE 2

Proteomics methods for subcellular proteome analysis

Romain Drissi, Marie-Line Dubois and François-Michel Boisvert¹

Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, 3201 Jean-Mignault,
Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada

Proteomics Methods for Subcellular Proteome Analysis

Romain Drissi, Marie-Line Dubois and François-Michel Boisvert¹

Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, 3201 Jean-Mignault,
Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada

¹ Corresponding author: François-Michel Boisvert

Phone: 819-820-6868 Ext.75430

Fax: 819-820-6831

Email: fm.boisvert@usherbrooke.ca

Running title: Subcellular proteome analysis

Keywords: Mass Spectrometry, SILAC, Proteomics, Organelle, subcellular compartment

38,086 characters with space

5,479 words

Summary

The elucidation of the subcellular distribution of proteins under different conditions is a major challenge in cell biology. This challenge is further complicated by the multi-compartmental and dynamic nature of protein localization. To address this issue, quantitative proteomics workflows have emerged to reliably identify the protein complement of whole organelles, as well as protein assignment to subcellular location and relative protein quantification based on different cell culture conditions. Here we review quantitative mass spectrometry-based approaches which combine cellular fractionation with proteomic analysis. The application of these methods to the characterization of organellar composition and to the determination of the dynamic nature of protein complexes is improving our understanding of protein functions and dynamics.

Introduction

Many pioneering organellar proteomics studies have focused on providing a detailed list of the protein contents of organelles, substructures or compartments isolated from cells following specific biochemical enrichment strategies [1-5]. Quantitative proteomics workflows are at the center of subcellular resolution proteomics and this notion sets them aside in the high-throughput assignment of proteins to subcellular compartments using methods such as protein correlation profiling [5, 6], by recording the number of ions detected per protein [3, 4] or localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT) [7, 8]. While these methods have allowed the characterization of protein localization within these organelles, the interpretation of these protein inventories is complicated by the fact that many proteins are not exclusive to one compartment but instead partition between separate subcellular locations [9, 10], highlighting the importance of measuring the relative abundance of proteins in different locations. Moreover, the dynamic nature of cellular processes underlines the need to assess how subcellular localization can change between different compartments under different cell growth and physiological conditions.

The challenge in organellar proteomics has now moved from the identification of proteins to measuring changes in protein abundance, modification state and localization within the cell. The emergence of this next generation of proteomics methods is characterized by the development of quantitative mass spectrometry-based methods that have moved from primarily identifying proteins, to also providing measurements of relative changes in protein levels or localization under different experimental conditions.

In this review, we describe recent advances in quantitative mass spectrometry based proteomics methods to study subcellular proteome arrangement and dynamic changes upon perturbations.

Single organelle proteomics

The combination of mass spectrometry-based proteomics methods and traditional biochemical fractionation protocols has been a logical step in the characterization of subcellular organization. The protein content of specific subcellular compartments can thus be identified following specific enrichment strategies that concentrate and enrich organelles and subcompartments of the cell. The importance of identifying a protein within a specific cellular compartment allows a better understanding of the function of both the protein and the compartment. Indeed, the ability to identify proteins of known function within a specific compartment is a strong indication that the function is either present within that compartment, or that regulation of these proteins can occur within it. Similarly, identifying an uncharacterized protein within a cellular compartment can provide clues to its function. The high-throughput of protein identification using proteomic methods is proving to be a key approach in elucidating the function of proteins by association and is an efficient way to study the complexity of mechanisms involved in the regulation of cellular functions [11].

The typical workflow consists of using a biochemical isolation method suitable for a specific organelle (Figure 1). Following the enrichment procedure, a verification of the purity of the isolated organelles is necessary. For example, the isolation of the organelle can be ensured by a specific enzymatic activity such as galactosyl transferase activity assay for the Golgi [12], using morphometric analysis at the electron microscopy level to assess homogeneity during the isolation [3] or by immunofluorescence microscopy [12]. However, none of those methods are likely to be as sensitive as MS/MS at detecting low levels of contaminations and will only allow the rough characterization of the enrichment method using known protein markers. The complex mixture of proteins generated will often be fractionated to reduce the complexity of the sample. Commonly-used methods consist of either one-dimensional SDS gel electrophoresis or two-dimension electrophoresis followed by in-gel digestion to generate peptides or of direct solubilization of proteins for in-solution digestion. Alternatively, proteins can be pre-fractionated using size exclusion chromatography or strong cation exchange prior to enzymatic digestion. The resulting mixture of peptides is then separated by high performance liquid chromatography (HPLC)

coupled to a mass spectrometer. Proteins will then be identified by tandem mass spectrometry using collision-induced dissociation to generate a set of fragments from a specific peptide ion. The sequencing of genomes of several species has resulted in the development of proteome databases allowing peptide matching of mass spectrometry data [13]. This allows an accurate identification of proteins in the original sample, providing an inventory of the proteins that are present in the isolated organelle.

For several compartments such as the nucleus or the mitochondrion, biochemical enrichment is generally easier to achieve by disrupting cells under mild conditions to maintain organelle integrity, followed by differential centrifugations allowing enrichment of seemingly intact organelles from the whole cell extract [1, 14]. Such methods for isolation of organelles are based on differences in sedimentation coefficients and densities of organelles. Organelles can thus be separated by density gradient centrifugation in buffers roughly preserving the integrity of the organelle. In a more chemically-oriented approach, detergents with increasing solubilization efficiency can be used to enrich specific cellular fractions [15, 16]. Nowadays, there are several commercially-available isolation kits that have been developed to separate different subcellular compartments, such as the QProteome Cell Compartment Kit (QIAGEN), the Subcellular Protein Fractionation Kit (Pierce) and several others. Most of these kits can be easily performed in bench-top centrifuges and are suitable for common subsequent mass spectrometry analysis, thereby increasing the reproducibility while being cost and time effective. However, such kits are often limited in what organelles can be enriched.

Free Flow Electrophoresis (FFE) is a highly versatile technology that has been introduced nearly 50 years ago for the separation of a wide variety of charged analytes including low-molecular weight organic compounds, peptides, proteins, protein complexes, membranes, organelles, and whole cells in aqueous media under native and denaturing conditions [17]. The analyte of interest is injected into a thin, laminar separation buffer film and deflected perpendicularly by an electric field. The absence of any kind of matrix results in high sample recoveries and fast fractionation times. Furthermore, the enrichment allows the visualization of less abundant proteins for subsequent separation by electrophoresis or LC-

MS analysis. Experiences using FFE for the enrichment of organelles were very limited up to now, but include for example isolation of peroxisomes [18] as well as endosomes, lysosomes and phagosomes [19]. Another method for enrichment of cell organelles is immunoprecipitation using specific antibodies directed against epitopes presented on the surface of the organelle [20]. Heterologous proteins or affinity tags such as TAP (tandem affinity purification) [21] and FLAG [22] presented on an organelle surface can also be used for the isolation of an organelle of interest by expressing a resident protein of that organelle. However, the introduction of a tag as well as overexpression of the tagged proteins can lead to mislocalization of the proteins.

This general approach of cellular fractionation to enrich fractions in specific organelles has been an area of intense activity in the past years and has yielded extensive lists of proteins associated with different subcellular compartments [23]. Several groups have been able to isolate diverse physical compartments to perform proteomic studies such the Golgi complex [24], clathrin-coated vesicles [25], mitochondria [14, 26], phagosomes [27], the nuclear envelope [28], as well as large functional complexes such as the nuclear pore [29] and the spliceosome [30]. Further derivation of these methods allowed researchers to increase the resolution of the enriched organelle. For example, an isolation of the Golgi described by Bell and colleagues [24] identified more than 1400 proteins in different components of the secretory pathway, which consists of rough and smooth ER, Golgi and Golgi-derived COPI vesicles [3]. Another example using a method combining high pH and proteinase K digestion for the global analysis of both membrane and soluble proteins from membrane-containing samples, Wu et al. provided one of the first analysis of the Golgi membrane proteome where it was possible to determine the orientation of the membrane proteins [31]. While most methods will solubilize membrane proteins and use specific proteases, the advantage of the method developed by Wu et al. is to provide information on membrane protein topology.

Another approach to organellar proteomics is to quantitatively follow the similarity of protein behavior during the enrichment procedure. The idea is that proteins within an organelle should be present with patterns similar to known proteins from the organelle of

interest. This principle is used in protein correlation profiling (PCP, [32]), which is based on the consensus profile obtained by measuring peptides generated by proteolysis of proteins from different fractions of a density centrifugation gradient. Andersen and co-workers identified 41 likely candidates of the centrosome and validated 23 novel components using PCP [32]. All of these proteins showed a correlation with already-known centrosomal proteins. Proteins present in lipid droplets have also been identified using PCP by correlating the enrichment profile of proteins identified by mass spectrometry to that of known lipid droplets proteins [33]. This method was particularly suitable due to the difficulty of isolating lipid droplets from other membrane-bound cellular organelles such as the endoplasmic reticulum, peroxisomes and endosomes. The authors were able to distinguish 111 lipid droplets proteins from the 1481 proteins identified in the different fractions [33].

The technological advances in mass spectrometry in recent years have moved the major source of error in organellar proteomics from the erroneous identification of proteins to the identification of contaminants (Figure 2). Indeed, many early experiments had a significant number of proteins identified as false positives resulting from misidentifications [34], often reflected by the inability of the instrument to reliably identify low abundance proteins in the sample. This led to a choice between being overly inclusive at the risk of increasing the error in the identification, or setting a very stringent threshold of confidence resulting in missing important protein components. Noteworthy, is the fact that many interesting proteins (i.e. poorly characterized) are of low abundance with tightly-regulated expression, while highly abundant and thus easily-identifiable proteins are often more ubiquitous or involved in structural cellular function [35]. Nowadays, proteomics techniques can identify thousands of proteins in enriched organelle samples where a substantially lower number of identifications would be expected. The additional identifications from seemingly highly pure fractions are thus most likely resulting from minute amounts of other proteins carried over during the purification procedure. This issue is exemplified in the isolation of nucleoli and the subsequent identification of nucleolar proteins. An isolation protocol for the nucleolus by a combination of sonication and sucrose density centrifugation was originally described [1] and identified 271 proteins in nucleoli including proteins with no known

nucleolar functions [36]. This number was increased to 489 proteins when studying the dynamics of protein influx within the nucleolus following inhibition of transcription [37] and later to the identification of over 4,500 proteins within isolated nucleoli [38]. Clearly, this number is getting nearer to the amount of proteins expressed in the whole cell and probably reflects the ability to identify contaminating proteins present in the enriched fraction.

All of the approaches described above allow the identification of proteins within the organelles following its isolation. However, the analysis of organellar content is complicated because many proteins are present in multiple compartments [9, 10]. As a result, only identifying a protein in a specific cell organelle is not sufficient, and it is necessary to study the quantitative distribution of proteins across organelles in order to draw a comprehensive picture of the biological system and to grasp the role of localization change in the regulation of biological processes. The measurement of the relative abundance of proteins in different locations, as well as the assessment of location changes between different compartments, under different cell growth and physiological conditions is thus necessary.

Subcellular resolution proteomics

Although organelle-based approaches can provide valuable information about specific subcellular compartments in isolation, it is also important to study protein localization in the context of the whole cell to obtain a system-wide view of proteome organization. When a protein is identified in an enriched organelle or subcellular compartment, it is often relevant to measure whether the protein identified is a main component of the organelle, is found partially localized in that compartment or whether it is merely a contaminant to the experiment (Figure 2). Intuitively, the identification of an abundant protein in a subcellular compartment suggests that the protein is mainly localized within that compartment, which would be reflected by its predominant localization within that compartment if tested by methods such as immunofluorescence microscopy (Figure 2). However, as the limit of detection of the mass spectrometers is improving, it is possible to

also identify proteins that are mostly localized elsewhere in the cell, but present in low amounts or under specific conditions within the organelle. While the identification of such proteins can still be relevant to the functions of the organelle, it deviates from the localization annotation of such proteins using more traditional methods (immunofluorescence microscopy, GFP tagging, biochemical fractionation, etc...). Finally, it is also possible to identify contaminants, both external to the experiment such as keratins, and internal to the experiment, such as proteins from elsewhere in the cells that never localize in the isolated organelle. In high-throughput assignment of proteins to subcellular fractions, quantitative proteomics methods have been developed to address the localization of proteins within the cells.

An extension to the protein correlation profiling method can be applied to the study of several subcellular compartments in a single experiment. Foster et al. mapped over 1400 proteins to as many as ten subcellular compartments including nuclear and cytosolic fractions using a combination of several well-characterized marker proteins [6]. With this approach, the localization of proteins is assigned simultaneously to ten different subcellular locations [6]. Although these methods do not use isotope labels, another method which has been developed is based on stable isotopic labels: the Localization of Organelle Proteins by Isotope Tagging or LOPIT [7]. LOPIT can also assign proteins to subcellular compartments based on the principle that proteins residing in the same organelle co-fractionate and show similar distribution profiles after density gradient centrifugation [39]. The protein distribution in the gradient fractions is correlated by western blotting using antibodies for a specific marker of each organelle. The measurement of the relative abundance of proteins between different fractions along the length of the gradients is possible with a labeling of the protein of each fraction using iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) [39] or ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) [7] for example. Using LOPIT based on iTRAQ labeling, more than 500 proteins were simultaneously localized in different organelles with quantitation of each protein relative to the studied organelles [40].

SILAC-based approaches can also be used to measure subcellular localization of proteins in the context of the whole cell. SILAC, or stable isotope labelling with amino acids in cell

culture, is the use of stable isotopic atoms along with mass spectrometry for quantitative analysis [41]. This method allows quantitative analyses of proteins by comparison of the mass of light and heavier forms of the same peptide from a given protein, arising from the presence of heavier, stable isotopes such as ^{13}C , ^2H and ^{15}N . A technique called spatial proteomics that measures the cellular distribution of thousands of proteins using a combination of cellular fractionation and mass spectrometry was recently developed [42]. This method involves first culturing cells with SILAC medium to ensure proteins are fully labeled [41]. The SILAC-incorporated cells are separated into fractions which are then recombined such that each fraction has a distinct isotope signature. The labeling thus allows quantification of the relative abundance of peptides originating from different subcellular fractions following the identification of proteins by mass spectrometry and was used to study the relative distribution of the proteome between the cytoplasm, nucleus and nucleolus [42].

These type of quantitative proteomics methods are particularly useful when sufficient enrichment of a specific organelle is not possible. Indeed, most methods providing an inventory of proteins in an organelle are not able to provide information on the multicompartmentalization of proteins and cannot differentiate potential contaminants. By using quantitative strategies that can provide an enrichment coefficient of proteins between different compartments, it is possible to measure the abundance of proteins in different compartment.

Dynamics of proteome localization

Although static snapshots of protein localization provide valuable information, the proteome dynamically responds in space and time [43]. One of the major challenges in cell biology is to not only assess the localization of proteins, but also study how the localization of proteins changes in response to perturbations or stimulations. Whereas imaging techniques allow high resolution analyses, they are often limited to a small number of proteins at a time. Mass spectrometry based methods are now emerging as a methodology

allowing both the quantification of the localization of proteins within the cells, and the measurement of dynamic changes in protein localization under different cellular conditions.

Some of the approaches that combined organellar isolation and MS analysis of the protein content have highlighted changes of the proteome in specific organelles in response to treatment. Several quantitative proteomics methods can be used to measure changes in the protein content of organelles. For example, an organellar proteomics approach was utilized to quantify alterations in protein abundance in mitochondria enriched from cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human epithelial ovarian cancer cell lines by spectral counting [44]. It is also possible to measure the flux of proteins going in and out of an organelle following a specific treatment by quantifying the changes at several time points, providing the dynamics of changes over time. Using SILAC and isolation of nucleoli, Andersen and colleagues were able to characterize changes in the protein content of the nucleoli in response to three different metabolic inhibitors [37]. These types of experiments provide an approach for the temporal characterization of the protein content of cellular organelles and demonstrate the dynamics of protein localization in specific subcellular compartments under different cellular growth conditions. However, using isolated organelles makes it difficult to differentiate between changes in protein expression and changes in protein localization.

An evolution of the SILAC-based spatial proteomics method can be used to quantify changes in protein localization. The comparison of ratios between two experiments allows identification of the subcellular location of uncharacterized proteins and determination of changes in the subcellular location of proteins in response to a stress. By comparing the variation in the ratio of one protein which is present in different compartments in response to a stimulus, a change of the location of the protein can be quantified. This method has been used to identify the changes in subcellular localization of proteins in response to the topoisomerase inhibitor etoposide, which leads to DNA double-stranded breaks [42], and the role of p53 in the regulation of the cellular response to DNA damage [45]. This method can thus provide accurate information at a proteome-wide level of the changes in protein localization. The spatial proteomics approach provides a discovery method to identify new

protein components of organelles, as well identify proteins affected by different cellular treatment. The results using this method can be used to further analyse and independently verify data from microscopy and molecular studies that are not readily applicable in a high-throughput manner and can be both used to characterize a wide range of different cell types and combined with alternative fractionation techniques to analyse multiple subcellular compartments and structures. In this particular case, cellular proteins were separated in cytoplasmic, nuclear and nucleolar fractions. Because of the limitation in the number of isotopes that can be used in a single experiment, the resolution thus far has been limited to only three [42] or four [46] subcellular compartment and a single time point following a cellular perturbation. However, it should be possible to increase the spatial and time resolution by using a reference protein set to compare each subcellular compartment and each time point in order to map protein flux in response to cellular stimuli.

Protein turnover and protein degradation are highly regulated biological processes which can occur in different cellular compartment. Therefore, characterizing mechanisms regulating protein degradation is relevant for understanding organelle dynamics and regulation. In general, the approaches described above have been used to identify the protein inventory over time or under different conditions. However, those approaches do not provide information regarding the mechanisms underlying those changes in protein dynamics. The use of stable isotope incorporation during protein translation can also be use transiently for pulse labelling of proteins to measure protein synthesis and degradation rates, a method called pulsed SILAC, or pSILAC [47]. This method has been combined with subcellular fractionation protocols to analyse protein degradation in multiple subcellular fractions of different human cell lines; HeLa [48] and U2OS [46] cells. Similarly, the turnover of nuclear proteins from rat livers and brains following metabolic labelling allowed the identification of extremely long lived proteins [49]. These studies analysed both global and compartment specific protein degradation, highlighting biological processes in which the control and compartmentalization of protein degradation is likely to play an important role.

Bioinformatics tools for the analysis of organelle proteomics data

Classification, interpretation and analysis of the data is of great importance in order to understand and share the results obtained in subcellular proteomics experiments. As such, bioinformatics tools have been developed to create databases and data repositories providing accessible inventories by merging the data of several organellar proteomics experiments [50]. A major initiative with the aim of standardizing protein attributed is the Gene Ontology project which classifies proteins by localization as well as by biological process and molecular function [51]. Interpretation of the data is also important in order to understand the different functions of organelles, and to infer protein function. Thus, it is possible to use this information to predict protein-protein interactions and protein localization, as well as identifying features such as protein localization signals. Improvement in organelle resolution when assigning protein-organelle association can also be achieved using algorithm that analyses several experiments that individually do not allow to fully differentiate different organelles [52], highlighting the need for robust analytical methodology allowing a better identification of protein localization.

Conclusion and outlook

Organellar proteomics has come a long way since the pioneering studies providing early inventories of different subcellular compartments to now being able to measure complex changes in proteomes of multiple compartments in single experiments. With the development of mass spectrometry-based methods for the characterization of protein localization and the accumulation of proteomic data, a more accurate organellar location of the proteome is emerging. The main challenge is now moving towards integrating the large amount of data generated in those studies. These types of experiments have been proposed as “third generation proteomics” [43], which has evolved from the development of methods for simple protein identification to now being able to measure the dynamic responses of entire proteomes in both space and time. The challenge ahead will now consist in increasing the spatial and time resolution of these experiments to provide a cell-wide mapping of the dynamic changes in protein subcellular localization. These next generation

of methods for measuring the localization of proteins on a large scale will have a major impact on cell biology, improving our understanding of protein localization and how cells respond to different conditions.

Acknowledgements

Funding to FMB is from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-123469) and from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (418404-2012).

Figure Legends

Figure 1

A typical organellar proteomics workflow

The typical workflow consists of using a biochemical enrichment method suitable for a specific organellar (1). The complex mixture of proteins generated is generally fractionated to reduce the complexity of the sample, most often by one-dimensional SDS gel electrophoresis (2) followed by in-gel digestion or directly solubilized and in-solution digested to generate peptides (3). This mixture of peptides is then separated by liquid chromatography (HPLC) coupled to a mass spectrometer (4), followed by data analysis for protein identification (5).

Figure 2

Identification of an organellar protein

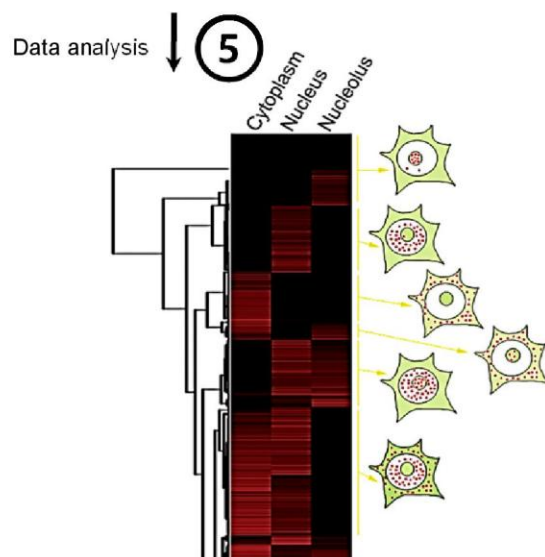
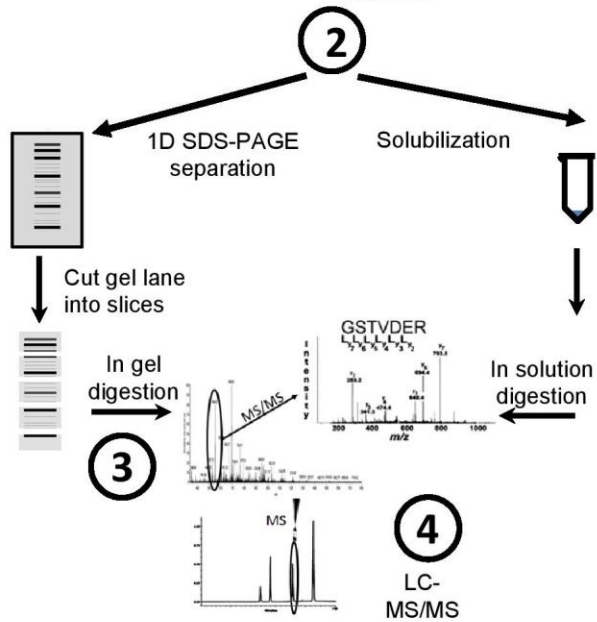
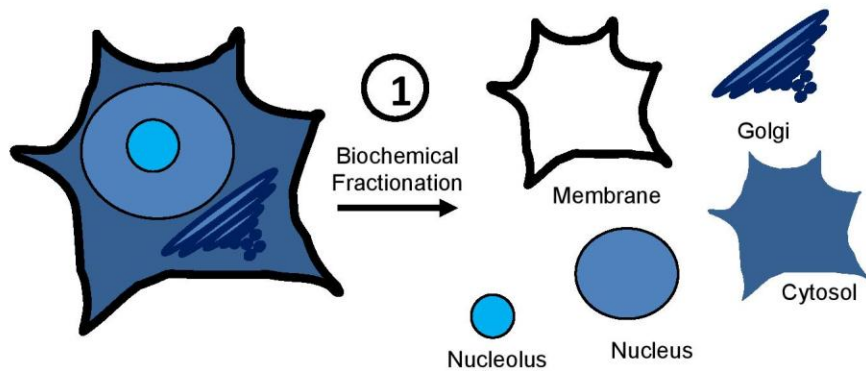
A protein identified in a fraction enriched in a specific organelle or in an enriched subcellular compartment (the nucleolus here as an example) can be a bona fide component of the organelle (1), a protein found partially localized in that compartment (2) or a protein predominantly found elsewhere in the cell, but also in small amount in the organelle of interest (3). It is also possible to identify contaminants, such as proteins within the cells that are normally never located within the isolated organelle (4) or proteins external to the experiment such as keratins (5).

References

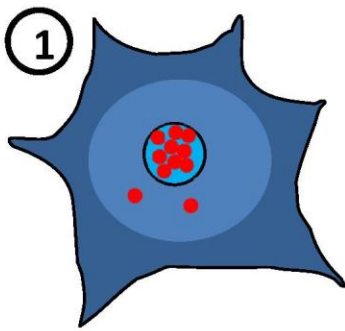
1. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M & Lamond AI (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current biology : CB* **12**, 1-11.
2. Andersen JS & Mann M (2006) Organellar proteomics: turning inventories into insights. *EMBO reports* **7**, 874-879, doi: 10.1038/sj.embor.7400780.
3. Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, et al. (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* **127**, 1265-1281, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.036.
4. Kislinger T, Cox B, Kannan A, Chung C, Hu P, Ignatchenko A, Scott MS, Gramolini AO, Morris Q, Hallett MT, et al. (2006) Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell* **125**, 173-186, doi: 10.1016/j.cell.2006.01.044.
5. Wiese S, Gronemeyer T, Ofman R, Kunze M, Grou CP, Almeida JA, Eisenacher M, Stephan C, Hayen H, Schollenberger L, et al. (2007) Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 2045-2057, doi: 10.1074/mcp.M700169-MCP200.
6. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK & Mann M (2006) A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**, 187-199, doi: 10.1016/j.cell.2006.03.022.
7. Dunkley TP, Watson R, Griffin JL, Dupree P & Lilley KS (2004) Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**, 1128-1134, doi: 10.1074/mcp.T400009-MCP200.
8. Sadowski PG, Dunkley TP, Shadforth IP, Dupree P, Bessant C, Griffin JL & Lilley KS (2006) Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nature protocols* **1**, 1778-1789, doi: 10.1038/nprot.2006.254.
9. Gauthier DJ & Lazure C (2008) Complementary methods to assist subcellular fractionation in organellar proteomics. *Expert review of proteomics* **5**, 603-617, doi: 10.1586/14789450.5.4.603.
10. Hall SL, Hester S, Griffin JL, Lilley KS & Jackson AP (2009) The organelle proteome of the DT40 lymphocyte cell line. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 1295-1305, doi: 10.1074/mcp.M800394-MCP200.
11. Walther TC & Mann M (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of cell biology* **190**, 491-500, doi: 10.1083/jcb.201004052.
12. Takatalo MS, Kouvonen P, Corthals G, Nyman TA & Ronnholm RH (2006) Identification of new Golgi complex specific proteins by direct organelle proteomic analysis. *Proteomics* **6**, 3502-3508, doi: 10.1002/pmic.200500516.
13. Noble WS & MacCoss MJ (2012) Computational and statistical analysis of protein mass spectrometry data. *PLoS computational biology* **8**, e1002296, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002296.
14. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW, et al. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature biotechnology* **21**, 281-286, doi: 10.1038/nbt793.
15. Ramsby ML, Makowski GS & Khairallah EA (1994) Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis* **15**, 265-277.
16. Sawhney S, Stubbs R & Hood K (2009) Reproducibility, sensitivity and compatibility of the ProteoExtract subcellular fractionation kit with saturation labeling of laser microdissected tissues. *Proteomics* **9**, 4087-4092, doi: 10.1002/pmic.200800949.
17. Hannig K & Wrba H (1964) [Isolation of Vital Tumor Cells by Carrier-Free Electrophoresis]. *Zeitschrift fur Naturforschung Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **19**, 860.

18. Volkl A, Mohr H, Weber G & Fahimi HD (1997) Isolation of rat hepatic peroxisomes by means of immune free flow electrophoresis. *Electrophoresis* **18**, 774-780, doi: 10.1002/elps.1150180519.
19. Tulp A, Verwoerd D, Benham A & Neefjes J (1997) High-resolution density gradient electrophoresis of proteins and subcellular organelles. *Electrophoresis* **18**, 2509-2515, doi: 10.1002/elps.1150181404.
20. Bauer A & Kuster B (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**, 570-578.
21. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, et al. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147, doi: 10.1038/415141a.
22. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183, doi: 10.1038/415180a.
23. Yates JR, 3rd, Gilchrist A, Howell KE & Bergeron JJ (2005) Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 702-714, doi: 10.1038/nrm1711.
24. Bell AW, Ward MA, Blackstock WP, Freeman HN, Choudhary JS, Lewis AP, Chotai D, Fazel A, Gushue JN, Paiement J, et al. (2001) Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**, 5152-5165, doi: 10.1074/jbc.M006143200.
25. Wasiak S, Legendre-Guillemain V, Puertollano R, Blondeau F, Girard M, de Heuvel E, Boismenu D, Bell AW, Bonifacino JS & McPherson PS (2002) Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *The Journal of cell biology* **158**, 855-862, doi: 10.1083/jcb.200205078.
26. Scharfe C, Zaccaria P, Hoertnagel K, Jaksch M, Klopstock T, Lill R, Prokisch H, Gerbitz KD, Mewes HW & Meitinger T (1999) MITOP: database for mitochondria-related proteins, genes and diseases. *Nucleic acids research* **27**, 153-155.
27. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C & Desjardins M (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *The Journal of cell biology* **152**, 165-180.
28. Dreger M, Bengtsson L, Schoneberg T, Otto H & Hucho F (2001) Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11943-11948, doi: 10.1073/pnas.211201898.
29. Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y & Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of cell biology* **148**, 635-651.
30. Neubauer G, Gottschalk A, Fabrizio P, Seraphin B, Luhrmann R & Mann M (1997) Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 385-390.
31. Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE & Yates JR, 3rd (2003) A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nature biotechnology* **21**, 532-538, doi: 10.1038/nbt819.
32. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA & Mann M (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-574, doi: 10.1038/nature02166.
33. Krahmer N, Hilger M, Kory N, Wilfling F, Stoeckl G, Mann M, Farese RV, Jr. & Walther TC (2013) Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 1115-1126, doi: 10.1074/mcp.M112.020230.
34. Steen H & Mann M (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**, 699-711, doi: 10.1038/nrm1468.

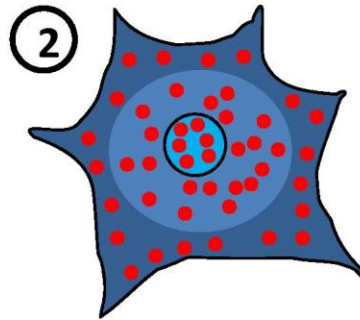
35. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, Herzog F, Rinner O, Ellenberg J & Aebersold R (2011) The quantitative proteome of a human cell line. *Molecular systems biology* **7**, 549, doi: 10.1038/msb.2011.82.
36. Leung AK, Andersen JS, Mann M & Lamond AI (2003) Bioinformatic analysis of the nucleolus. *The Biochemical journal* **376**, 553-569, doi: 10.1042/BJ20031169.
37. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI & Mann M (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**, 77-83, doi: 10.1038/nature03207.
38. Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, Cobley A & Lamond AI (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic acids research* **37**, D181-184, doi: 10.1093/nar/gkn804.
39. Tan DJ, Dvinge H, Christoforou A, Bertone P, Martinez Arias A & Lilley KS (2009) Mapping organelle proteins and protein complexes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of proteome research* **8**, 2667-2678, doi: 10.1021/pr800866n.
40. Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, et al. (2006) Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6518-6523, doi: 10.1073/pnas.0506958103.
41. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A & Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**, 376-386.
42. Boisvert FM, Lam YW, Lamont D & Lamond AI (2010) A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**, 457-470, doi: 10.1074/mcp.M900429-MCP200.
43. Lamond AI, Uhlen M, Horning S, Makarov A, Robinson CV, Serrano L, Hartl FU, Baumeister W, Werenskiold AK, Andersen JS, et al. (2012) Advancing cell biology through proteomics in space and time (PROSPECTS). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, O112 017731, doi: 10.1074/mcp.O112.017731.
44. Chappell NP, Teng PN, Hood BL, Wang G, Darcy KM, Hamilton CA, Maxwell GL & Conrads TP (2012) Mitochondrial proteomic analysis of cisplatin resistance in ovarian cancer. *Journal of proteome research* **11**, 4605-4614, doi: 10.1021/pr300403d.
45. Boisvert FM & Lamond AI (2010) p53-Dependent subcellular proteome localization following DNA damage. *Proteomics* **10**, 4087-4097, doi: 10.1002/pmic.201000213.
46. Larance M, Ahmad Y, Kirkwood KJ, Ly T & Lamond AI (2013) Global subcellular characterization of protein degradation using quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 638-650, doi: 10.1074/mcp.M112.024547.
47. Schwanhauser B, Gossen M, Dittmar G & Selbach M (2009) Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC. *Proteomics* **9**, 205-209, doi: 10.1002/pmic.200800275.
48. Boisvert FM, Ahmad Y, Gierlinski M, Charriere F, Lamont D, Scott M, Barton G & Lamond AI (2012) A quantitative spatial proteomics analysis of proteome turnover in human cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111 011429, doi: 10.1074/mcp.M111.011429.
49. Savas JN, Toyama BH, Xu T, Yates JR, 3rd & Hetzer MW (2012) Extremely long-lived nuclear pore proteins in the rat brain. *Science* **335**, 942, doi: 10.1126/science.1217421.
50. Donnes P & Hoglund A (2004) Predicting protein subcellular localization: past, present, and future. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **2**, 209-215.
51. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**, 25-29, doi: 10.1038/75556.
52. Trotter MW, Sadowski PG, Dunkley TP, Groen AJ & Lilley KS (2010) Improved sub-cellular resolution via simultaneous analysis of organelle proteomics data across varied experimental conditions. *Proteomics* **10**, 4213-4219, doi: 10.1002/pmic.201000359.



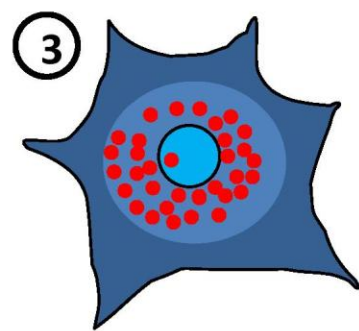
Ambiguity of protein identifications in single organelle preparations



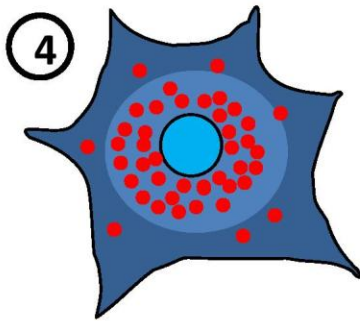
Proteins that are predominately located in the organelle



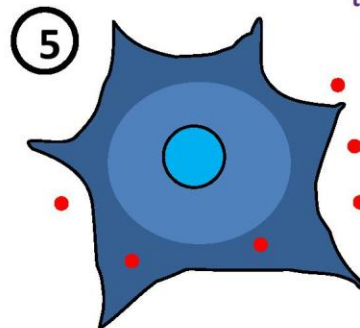
Proteins that are evenly distributed in the cell



Proteins that are predominately located elsewhere, but a small portion is found in the organelle



Endogenous contaminants:
Proteins that are not in the
organelle of living cells but are co-
purified



Exogenous contaminants: Proteins not
associated with the cells